Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
— Bereich Stoffwechsel —
im Klinikum Charlottenburg
der Freien Universität Berlin

Kollagenabbau in Beziehung zur Kollagensynthese bei der Narbenbildung der Haut

Inaugural — Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Martin Zeltz

aus Driedorf/Dillkreis

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544720_0027

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
— Bereich Stoffwechsel —
im Klinikum Charlottenburg
der Freien Universität Berlin

Kollagenabbau in Beziehung zur Kollagensynthese bei der Narbenbildung der Haut

Inaugural — Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Martin Zeitz
aus Driedorf/Dillkreis

1977

Referent: Prof. Dr. med. Antonio Ruiz-Torres

Korreferent: Prof. Dr. med. Günter Stüttgen

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25. August 1977

Meinen Eltern

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung 7

B. Kollagenstoffwechsel und Narbenbildung
1. Kollagensynthese 8
2. Kollagenabbau 11
3. Untersuchungen über den Kollagenmetabolismus 13
4. Dynamik der Wundheilung 16

C. Methoden
1. Tiermaterial 19
2. Versuchsanordnung 19
3. Technisches Vorgehen 21
4. Biochemische Untersuchungen
a. Aufarbeitung der Gewebe 23
b. Die quantitative Aminosäurenbestimmung 23
c. Die säulenchromatographische Isolierung der markierten Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin 24
d. Die quantitative Hydroxyprolinbestimmung 24
e. Die quantitative Prolinbestimmung 26
f. Die Radioaktivitätsmessung 26
5. Berechnungen und Ergebnisdarstellung 27
6. Morphologische Untersuchungen 28

D. Ergebnisse
1. Die Aminosäurenzusammensetzung der Haut und des Narbengewebes 29
2. Morphologische Befunde des Wundheilungsprozesses 35
3. Der Verlauf der spezifischen Aktivität und der Gesamtaktivität in Haut und Serum 36
4. Befunde zum Kollagenumsatz im Narbengewebe
a. Narbengewebe des 3. bis 21. Tages 4o
b. Umsatzraten im Narbengewebe des 3., 5. und 7. Tages 43

E. Diskussion 51

F. Zusammenfassung 59

G. Bildanhang 61

H. Literatur 94

Lebenslauf

A. Einleitung

Kollagensynthese und Kollagenabbau stehen unter physiologischen Bedingungen im Organismus im Gleichgewicht, so daß der Gesamtkollagengehalt eines Organs konstant bleibt. Eine Störung dieses Gleichgewichts tritt bei jedem Schaden auf, der zum Gewebsuntergang führt, so beim Infarkt, beim toxischen Schaden und bei der Wundheilung. Der Organismus reagiert auf einen solchen Defekt mit der Bildung einer kollagenreichen Narbe bzw. mit der diffusen Fibrose eines Organs. Der Kollagenpool ändert sich also für die Dauer der Schadensreparation um sich danach wieder auf einem konstanten Niveau einzupendeln. Ziel dieser Arbeit ist es, die Dynamik, die zur Kollagendeposition führt, zu untersuchen. Als pathogenetische Mechanismen kommen in Frage: eine numerische Zunahme der für die Kollagensynthese zuständigen Zellen bei konstanter Bildung und Abbau, eine vermehrte Synthese bei konstantem Abbau sowie eine Verminderung des Abbaus bei gleichbleibender oder vermehrter Synthese.

Als Modell für dieses Vorhaben wurden offen granulierende Hautwunden gewählt. Über das Angebot und die Anreicherung von Kollagen im Granulationsgewebe gibt es zahlreiche Untersuchungen (siehe z.B. Dunphy u. Udupa 1955; Grillo et al. 1958; Bothwell 1964; Stein u. Keiser 1971; Barnes et al. 1975). Es ist sicher, daß die globale Produktion an Kollagen erhöht ist, obwohl die Syntheseleistung der einzelnen Zelle durch die hier vorhandenen, ungünstigen Milieuverhältnisse eher herabgesetzt sein dürfte. Ausschlaggebend wäre daher die numerische Zunahme der hierfür fähigen Zellen.

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, daß neben der Synthesesteigerung eine Veränderung des Kollagenabbaus bei der Kumulation im Wundgebiet eine wesentliche Rolle spielt. Möglicherweise steuert sogar die Umgebung der Wunde diesen Prozeß. So findet z.B. Ruiz-Torres et al. (1976) bei der mit CCl_4 geschädigten Leber, daß korrelierend zum frischen Stadium des Schadens der Kollagenabbau abnimmt.

Sehr aufschlußreich erscheinen die Untersuchungen von Abercombie et al. (1960). Sie hielten Hautwunden bei Kaninchen künstlich

mit Schienen offen, so daß nach Entfernung der spreizenden Schiene die Wundkontraktion einsetzen konnte. Hierbei ließ sich ein starker Abfall des Kollagengehaltes im Granulationsgewebe nachweisen; das Absinken wird nicht beobachtet, wenn die Schienen belassen werden (James u. Newcombe 1961). Dies spricht dafür, daß die Zellen des umgebenden, erhaltenen Gewebes den Kollagenabbau beeinflussen; nach Füllung des durch den Schaden gesetzten Defektes verhindern sie ein weiteres Wachsen dieses narbigen Bereiches. Grillo und Gross (1967) sowie Donoff et al. (1971) konnten eine hohe Kollagenasefreisetzung aus Gewebekulturen von Wundrändern nachweisen. Dabei wurde sowohl von den proliferierenden Epithelzellen als auch von den mesenchymalen Zellen Kollagenase produziert. Die Kollagenasefreisetzung der mesenchymalen Zellen konnte durch die Gegenwart von epithelialen Zellen induziert werden. Offensichtlich scheint beim Regulationsprozeß der Kollagenkumulation im Narbengewebe eine mesenchymal - epitheliale Wechselwirkung eine wesentliche Rolle zu spielen.
Diese Arbeit beschreibt verschiedene Versuchsanordnungen, die zur Ermittlung der Kollagenabbauraten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wundheilung dienen. Es werden Beziehungen zur Synthese dieses Materials sowie zum morphologischen Zustand hergestellt. Ziel ist es, wesentliche Regulationsvorgänge der Kollagenkumulation im Narbengewebe weiter zu ergründen.

B. Kollagenstoffwechsel und Narbenbildung

1. Kollagensynthese

Das Kollagen ist ein fibrillärer Eiweißkörper, der den Hauptbestandteil der Hauteiweiße, des straffen Bindegewebes (Sehnen, Faszien, Bänder) und der Interzellularsubstanz von Knorpel und Knochen darstellt und etwa 1/5 des Körpereiweißes ausmacht (Harkness 1961). Seine wesentliche Bedeutung besteht in seinen physiologischen Aufgaben, wie mechanische Aufgaben - Stabilisierung der äußeren Körperhülle, Stütz- und Fortbewegungsfunktion, Auf-

hängung von Organen und Bildung von Verschiebe- und Gleitschichten - und nutritive Aufgaben als Transitstrecke für den Stofftransport von den Kapillaren zu den organspezifischen Zellen. Außerdem erhält das Kollagen pathophysiologische Bedeutung als Reparaturmaterial für Gewebsdefekte und zur Abgrenzung gegen Fremdkörper.

Das Kollagen hat als Eiweißkörper eine charakteristische, genetisch festgelegte Aminosäurenzusammensetzung. Über die Hälfte aller Aminosäuren bestehen aus Glyzin, Prolin und Hydroxyprolin. Weitere in der Sequenz häufige Aminosäuren sind Alanin, Glutaminsäure, Asparaginsäure, Arginin und Lysin. Tyrosin und Histidin erscheinen nur in sehr geringen Mengen im Kollagen, Cystein und Tryptophan sind im Allgemeinen nicht nachweisbar (Eastoe 1955; Piez u. Gross 1959; Eastoe 1967; Traub u. Piez 1971). Besonders typisch für das Kollagen sind Hydroxyprolin und Hydroxylysin, von denen man lange annahm, daß sie im Organismus ausschließlich im Kollagen vorkommen. Obwohl beide Aminosäuren auch in einer Unterfraktion des Komplements, dem C1q (Reid et al. 1972; Reid 1974) und im Elastin (Eastoe 1967) nachgewiesen werden konnten, haben sie ihre wesentliche Bedeutung für Untersuchungen des Kollagenstoffwechsels nicht verloren.

Die Grundeinheit des Kollagenmoleküls ist das Tropokollagen. Es ist ein Makromolekül von 28o nm Länge und 1,5 nm Breite, sein Molekulargewicht beträgt ca. 3oo ooo (von Hippel 1967). Es weist einen charakteristischen Aufbau aus drei Einzelketten auf, die wiederum typisch für das Gewebe sind, aus dem das Kollagen stammt (Gallop et al. 1972).

Als kollagensynthetisierende Zellen wurden durch autoradiographische Untersuchungen, in vitro-Studien und viele morphologische Befunde eindeutig die ortsständigen Bindegewebszellen, die Fibroblasten, sowie deren abgeleitete Zellen wie Chondro- und Osteoblasten identifiziert (z.B. Merker 1961; 1961a; Lindner 1963; Ross u. Benditt 1965; Ross 1968; Merker u. Struwe 1971).

Bis zur Ausbildung der mechanisch stabilen Kollagenfibrille werden verschiedene Synthesestufen durchlaufen. Der erste Schritt, die Aminosäurenaddition, findet analog zu anderen proteinsezernierenden Zellen an den Ribosomen des rauhen endoplasmatischen Retikulums statt (Merker 1961a; Ross u. Benditt 1962; Rohr 1965;

Fernandez-Madrid 1967; 197o; Weinstock u. Leblond 1974). Ihre Zahl und die Menge der endoplasmatischen Membranen sind deshalb auch morphologische Kriterien zur Beurteilung der Synthese- und Sekretionsrate des betreffenden Fibroblasten. Die erste postribosomale Veränderung ist die Hydroxylierung bestimmter Prolin- und Lysinreste mittels spezieller Hydroxylasen (Gould 1968; Halme et al. 197o; Gallop et al. 1972). Dieser Schritt ist die Voraussetzung für die spätere Aggregation und Stabilität des Moleküls (Berg u. Prockop 1973). Gleichzeitig werden auf einen Teil der Hydroxylysinreste Galaktose- oder Galaktosylglukosereste mit spezifischen Transferasen übertragen. Während dieser Schritte gelangt das Kollagen zunächst in die Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums und wird von hier wahrscheinlich über einen Vesikelfluß via Golgi-Apparat nach außen abgegeben (Ross u. Benditt 1962; 1965; Rohr 1965; Merker u. Struwe 1971; Weinstock u. Leblond 1974; Harwood et al. 1976). Vermittelt durch ein zusätzliches, Tryptophan-haltiges Peptid am N-terminalen Ende der Pro-alpha-Ketten lagern sich drei alpha-Ketten zur typischen Tripelhelix zusammen (Tkocz u. Kühn 1969; Speakman 1971; Kühn 1974). Nach enzymatischer Abspaltung dieser terminalen Enden ist das Tropokollagenmolekül fertig (Kühn 1974). Nach der Sekretion sind die kollagenen Vorstufen in Form einer marginalen Kondensation auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Die dicht verfilzten Filamente strecken sich, lagern sich parallel zueinander und verschmelzen zu ersten Kollagenfilamenten. Sie stellen den Kern der späteren Fibrille, die durch weitere Aggregation und Auflagerung von Topokollagenmolekülen entsteht, dar (Yardley et al. 196o; Merker 1961a; Fernando u. Movat 1963; Bublitz 1973).

Die elektronenoptisch darstellbare Querstreifung der kollagenen Fibrille mit einer Periodik von 6o - 7o nm weist auf eine hochgeordnete Zusammenlagerung der Bausteine hin. Üblicherweise lagern sich die Tropokollagenmoleküle jeweils um ein viertel ihrer Länge verschoben zusammen (Hodge 1967).

Ein wichtiger Schritt für die Verfestigung der Fibrille ist die Ausbildung intermolekularer Quervernetzungen. Im ersten Schritt der Quervernetzungsreaktion werden Lysin- und Hydroxylysinreste durch das Enzym Lysyloxydase zu Aldehyden oxydiert (Born-

stein u. Piez 1966; Schiffmann u. Martin 197o). Nach der Zusammenlagerung der Moleküle zu Fibrillen reagieren die Lysin- und Hydroxylysinaldehyde unter Bildung von Schiff'schen Basen und Aldolverbindungen (Gallop et al. 1972). Dieser Bindungstyp ist noch reversibel und säureempfindlich und wird in einem dritten Schritt durch reduktive Prozesse in stabile Quervernetzungen überführt (Robins et al. 1973). Dies ist ein Vorgang, der sich vorwiegend beim Altern der entsprechenden Gewebe ausbildet.
Die Fibrillogenese ist mit der Ausbildung der typischen quergestreiften Fibrille noch nicht abgeschlossen. Durch weitere Auflagerung und geordnete Bindung von Tropokollagenmolekülen wächst die Fibrille weiter in die Breite, bis sie eine bestimmte charakteristische Dicke erreicht hat. Diese ist typisch für jedes Organ, Alter und Spezies und kann in Abhängigkeit von der Funktion innerhalb festgelegter Grenzen variieren (Merker 1974).
Die ebenfalls von den Fibroblasten synthetisierten Proteoglykane (Taylor u. Saunders 1957; Mancini et al. 1961; Merker u. Struwe 1971) scheinen bei der Bildung der kollagenen Fibrillen eine wesentliche Rolle zu spielen: elektronenmikroskopische und biochemische Befunde weisen darauf hin, daß die Proteoglykane bei der Zusammenlagerung der Tropokollagenmoleküle als Matrize wirken (Jackson, D.S. u. Bentley 1968; Mathews 197o; Merker u. Günther 1973).
Zur Fibrillogenese im weiteren Sinn zählt noch die Faserbildung und die Texturbildung.

2. Kollagenabbau

Kollagen unterliegt wie alle Körpereiweiße einem ständigen Umsatz. Da Kollagen in fibrillärer Form und bei physiologischer Temperatur von den Proteasen der meisten Gewebe nicht angegriffen wird, suchte man nach speziellen kollagenspaltenden Enzymen. So gelang es 1962 Gross und Lapiere eine Kollagenase aus Zellkulturen von Kaulquappenschwänzen darzustellen. Mit Hilfe der von diesen Untersuchern entwickelten Methode wurden in den darauffolgenden Jahren Kollagenasen in vielen Körpergeweben unter physiologischen und pathologischen Bedingungen nachgewiesen

(siehe Reviews bei Harris u. Krane 1974; Nordwig 1971; Seifter u. Harper 197o); so auch in der menschlichen (Eisen et al. 1968) und in der Rattenhaut (Tokoro et al. 1972), in Granulozyten (Lazarus et al. 1968; Robertson et al. 1972) und bei der Wundheilung (Grillo und Gross 1967; Donoff et al. 1971).
Alle bisher beschriebenen tierischen Kollagenasen haben ein Wirkungsoptimum bei neutralem pH und spalten die Kollagenmoleküle unterhalb ihrer Denaturierungstemperatur auf eine charakteristische Art und Weise (Gross u. Nagai 1965; Eisen et al. 1968; Tokoro et al. 1972; Woolley et al. 1975; Miller et al. 1976): Das aktive Enzym spaltet das Tropokollagenmolekül, welches in fibrillärer Form vorliegt, durch alle drei Ketten hindurch, so daß zwei Fragmente entstehen, ein N-terminales von 75% der ursprünglichen Länge (TC^{A}_{75}) und ein carboxyterminales von 25% der ursprünglichen Länge (TC^{B}_{25}). Bei einigen Spezies kommt es zu einer weiteren Aufspaltung der Fragmente (Tokoro et al. 1972; Woolley et al. 1975). Die abgetrennten Fragmente haben eine wesentlich niedrigere Denaturierungstemperatur als natives Kollagen; die Denaturierung tritt hier bereits bei $32^{o}C$ ein. Als denaturierte, gelöste, gelartige Polypeptide werden sie zum einen von bei neutralem pH reagierenden Proteasen im Extrazellulärraum weiter abgebaut(Harper u. Gross 197o; Harris u. Krane 1972), zum anderen phagozytiert und von lysosomalen Enzymen weiterverdaut (Parakkal 1969). Bei Vorgängen sehr schneller Resorption von Kollagen, wie z.B. der Uterus post partum, kann ein zusätzlicher Mechanismus hinzukommen: Größere Kollagenfragmente, die noch durch Quervernetzungen miteinander verbunden sind und somit noch unlöslich sind, werden phagozytiert und von spezifischen Proteasen wie das Kathepsin B1 weiter aufgespalten (Burleigh et al. 1974; Harris u. Krane 1974; Gibson et al. 1976).
Die Wirkung der Kollagenasen scheint auf zwei verschiedene Arten vom Organismus kontrolliert zu werden (Bauer et al. 1972). Für Kollagenasen von Kaulquappen, menschlichen Leukozyten und Mäuseknochen konnten inaktive Proenzyme dargestellt werden (Harper u. Gross 1972; Vaes 1972; Oronsky et al. 1973). Zum anderen existieren in extrazellulären Flüssigkeiten Inhibitoren der Enzymaktivität, so das $alpha_1$-Antitrypsin und das $alpha_2$

Makroglobulin (Eisen et al. 1971).
Ein Problem stellt die morphologische Erfassung von Kollagenabbauprozessen dar. Untersucht wurden vorwiegend Zustände mit sehr schneller Resorption von Kollagen, so die Rückbildung des Schwanzes bei der Metamorphose der Kaulquappe (Usuku u. Gross 1965), die Involution des post partum Uterus (Luse und Hutton 1964; Schwarz u. Güldner 1967; Brandes und Anton 1969; Parakkal 1972), die Kollagenresorption in Carrageenin-Granulomen (Pérez-Tamayo 197o) und beim Haarwachstumszyklus (Parakkal 1969). Morphologisch faßbare Zeichen waren Makrophagen oder makrophagenähnliche Zellen mit zytoplasmatischen Vakuolen, die Kollagenfibrillen enthielten. Die intrazellulären Kollagenfibrillen wiesen zum Teil die Zeichen einer Desintegration auf. Parakkal (1972) konnte in den Vakuolen histochemisch saure Phosphatase nachweisen, was zeigt, daß sich die Fibrillen innerhalb von Phagolysosomen befinden. Morphologische Zeichen eines extrazellulären Kollagenabbaus werden lediglich von Pérez-Tamayo (197o) in Carrageenin-Granulomen beschrieben. Sie ähneln den Befunden von Woolley et al. (1975), die unlösliches Kollagen in vitro der Wirkung hoch gereinigter Kollagenase aussetzten: Die Fibrillen sind ausgefranst, in ihrem Durchmesser reduziert, Mikrofibrillen sind aus der Hauptstruktur herausgebrochen.
Auf eine mögliche Rolle der Fibroblasten bei Kollagenabbauprozessen weist Ten Cate: Er beschreibt Kollagenfibrillen-enthaltende Vakuolen in Fibroblasten im Periodontium und im Granulationsgewebe. Die Vakuolen identifiziert er als Phagolysosomen und schreibt somit den Fibroblasten eine resorptive Funktion zu (Ten Cate u. Freeman 1974; Ten Cate u. Deporter 1975).

3. Untersuchungen über den Kollagenmetabolismus

Die Inkorporierung von markierten Aminosäuren in Kollagen wird als Methode verwandt, um die Stoffwechselaktivität des Kollagens festzustellen. Frühe Untersuchungen mit markiertem Glyzin als Tracer zeigten, daß Kollagen als ganzes ein relativ stoffwechselträges Körpereiweiß ist (Neuberger et al. 1951; Neuberger u. Slack 1953; Thompson u. Ballou 1956). Die Ergeb-

nisse waren zum Teil sehr widersprüchlich, bedingt auch dadurch, daß mit Glyzin ebenso eine hohe Markierung nicht kollagenen Eiweißes auftritt. Wesentliche Fortschritte brachte die Verwendung von markiertem Prolin als Tracer und die Messung der spezifischen Radiomarkierung des Hydroxyprolins (z.B. Gerber et al. 1960; 1962; Lindstedt u. Prockop 1961; Prockop 1964; Koch, H. et al. 1971; Emmrich et al. 1972; Koch,I. u. Ruiz-Torres 1976; Ruiz-Torres et al. 1976; Skalicky et al. 1976). Markiertes Prolin wird in kollagenes Eiweiß als Prolin und als Hydroxyprolin eingebaut; in geringem Umfang werden auch die Aminosäuren Glutaminsäure, Alanin und Glyzin markiert (Ruiz-Torres u. Kürten 1974). Wesentlich ist dabei, daß die Umwandlung des Prolins zum Hydroxyprolin erst nach Einbau in die Polypeptidketten der kollagenen Vorstufen zu erfolgen scheint (Prockop 1970; Gallop et al. 1972). Freies bzw. peptidgebundenes, markiertes Hydroxyprolin rekrutiert sich daher in erster Linie aus dem Kollagenabbau (Prockop u. Kivirikko 1968).
Bei weiteren Untersuchungen des Kollagenstoffwechsels mit markierten Aminosäuren konnte zunächst ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Löslichkeitsformen des Kollagens und der Stoffwechselaktivität dieser Fraktionen gefunden werden. Die schnellste und höchste Markierung, sowie den schnellsten Abfall wies das neutralsalzlösliche Kollagen auf, es folgte das in saurem Citratpuffer extrahierbare und schließlich das unlösliche Kollagen mit kaum erfaßbarer Halbwertszeit (Jackson, D.S. u. Bentley 1960; Kao et al. 1961; Gerber et al. 1962; Nimni u. Bavetta 1964). Prockop (1964) verglich die spezifische Aktivität des Hydroxyprolins im Urin und im löslichen und unlöslichen Kollagen bezüglich ihres zeitlichen Ablaufs. Aus diesen und aus früheren Befunden (Lindstedt u. Prockop 1961) entwickelte er ein Modellschema des Kollagenstoffwechsels: Nach dem Einbau des Prolins in die Polypeptidketten und der Hydroxylierung werden zunächst extrazellulär die löslichen Kollagenfraktionen abgelagert, aus diesen bilden sich die weniger gut löslichen und unlöslichen Fraktionen. Zwischen den verschiedenen Löslichkeitsformen besteht ein Fließgleichgewicht, wobei der Abbau aus allen Fraktionen möglich erscheint. Bei jungen Tieren stammen die kollagenen Abbauprodukte vorwiegend aus der löslichen Fraktion,

bei alten überwiegend aus der unlöslichen. Von dem beim Abbau freigesetzten Hydroxyprolin erscheinen höchstens 5 - 1o% im Urin, der Rest wird weiter abgebaut (Prockop u. Kivirikko 1968).

Weitere Fortschritte in der Analyse des Kollagenstoffwechsels brachte die Einführung von Strukturmodellen (Compartment-Systemen) und die Anwendung der Gesetze der Isotopenkinetik (Koblet 1971). So untersuchten Emmrich et al. (1972) das Organbindegewebe verschiedener Organe der Ratte an Hand eines solchen Strukturmodells. Die Kollagenfraktionen wurden hier nicht nach physikochemischen Löslichkeitskriterien, sondern nach ihrer Stoffwechselgeschwindigkeit unterschieden und der Anteil der stoffwechselaktiven Fraktion am Organbindegewebe bestimmt: So zeigte sich ein besonders hoher Anteil der stoffwechselaktiven Fraktion in der Aorta (12%, HWZ=5 Tage) und im Knochen (9%, HWZ= 3 Tage). Rödenbeck u. Mitarbeiter (1975) simulierten dieses Strukturmodell auf dem Analogcomputer, um durch Variation der verschiedenen, das System bestimmenden Parameter Rückschlüsse auf den Stoffwechsel unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen ziehen zu können.

Die Stoffwechselkinetik im Sehnen- und Hautkollagen in Abhängigkeit vom Alter wurde an Hand eines Compartment-Modells von Skalicky et al. (1976) untersucht: Die Aufteilung erfolgte in drei Compartments, das Pro- und Tropokollagen, das labile polymere und das stabile polymere Kollagen. Wesentliche Aussagen sind: eine im Alter verlangsamte Synthese aller Fraktionen, die Bildung von labilem und stabilem polymeren Kollagen aus unterschiedlichen Tropokollagenmolekülen, eine Umschaltung der Kollagensynthese vom labilen zum stabilen Kollagen im Alter sowie ein extrazellulärer Alterungsprozeß, der stabiles polymeres Kollagen vermehrt einem proteolytischen Abbau zugänglich macht.

Eine mögliche Fehlerquelle bei der Bestimmung der Halbwertszeit des Kollagens mittels ^{3}H-Prolin wiesen Jackson, S.H. und Heininger (1975) auf: Wenn man eine Doppelmarkierung des Hydroxyprolins mit $^{18}O_2$ und ^{3}H-Prolin vornimmt, so findet man für das ^{18}O-Hydroxyprolin eine wesentlich niedrigere Halbwertszeit als für das ^{3}H-Hydroxyprolin. Die Autoren folgern aus diesen Ergeb-

nissen, daß das beim Kollagenabbau freiwerdende ^{3}H-Prolin in erheblichem Umfang (bis zu 93%) für die Neusynthese wieder verwendet wird. Die so ermittelte Halbwertszeit gibt also einen zu hohen Wert an. Ruiz-Torres und Kürten (1976) konnten auch für Hydroxyprolin ein Recycling nachweisen; das Recycling erfolgt wahrscheinlich via Glyzin - Prolin.
Die wesentliche Bedeutung der Bestimmung der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins für die Stoffwechseldynamik des Kollagens wird hierdurch aber nur unwesentlich eingeschränkt, insbesondere, wenn nur vergleichende Untersuchungen der Stoffwechselraten durchgeführt werden.

4. Dynamik der Wundheilung

Jeder Defekt eines Gewebes, sei er durch Trauma, Ischämie oder toxischen Zelluntergang entstanden, wird, sofern er die Basalmembran und das angrenzende Gefäßbindegewebe mit zerstört hat, durch ein Ersatzgewebe (Granulationsgewebe) ausgefüllt. Grob gesehen kann man zwei sich bedingende und ineinander übergehende Phasen der Wundheilung unterscheiden, die resorptive und die reparative Phase (eine detaillierte Diskussion findet sich bei Gillman 1968).
Nach primärem Verschluß des Defektes durch einen Gerinnungsthrombus, kollagene Fasern spielen bei der Adhäsion der Thrombozyten eine wesentliche Rolle (Spaet et. al. 1962; Zucker u. Borrelli 1962), setzt bereits nach Stunden eine Migration von Leukozyten und etwas verspätet von Monozyten in die Nekrosezone ein. Diese Zellen, insbesondere die Monozyten als Makrophagen, sind dazu in der Lage, nekrotisches Material zu phagozytieren und durch ihre lysosomalen Enzyme abzubauen. Rund 24 Stunden nach Prozeßbeginn sprossen Kapillarknospen vom Defektrand und -grund in die Nekrosezone ein (Sandison 1928); in direkter Beziehung zu dieser Kapillarneubildung tritt eine rege Proliferation von Fibroblasten auf, bis sie die dominierende Zellart im Wundgebiet werden (Stearns 1940; Gillman 1968; Ross 1968a; Peacock u. van Winkle 1970). Die im Granulationsgewebe erschienenen Fibroblasten haben eine nicht eindeutig geklärte

Herkunft. Möglicherweise stammen sie durch Transformation von Blut- und Knochenmarkszellen (Allgöwer u. Hulliger 196o) oder auch von lokalen Bindegewebszellen in Nachbarschaft der Wunde ab (MacDonald-1959; Grillo 1963; Ross et al. 197o). Der hohe Gehalt an rauhem endoplasmatischen Retikulum, der Golgi-Apparat mit einer über das ganze Zytoplasma verstreuten, vesikulären Komponente und die großen Mitochondrien deuten auf eine hohe Syntheseleistung der Fibroblasten hin (Merker 1961; Fernando u. Movat 1963; Ross 1968; 1968a). Sie sind für die Synthese von Kollagen und Proteoglykanen zuständig (s.o.). Neben der reparativen Bildung des Bindegewebes ist aber auch die reparative Epithelisierung des Defektes bei Hautwunden von wesentlicher Bedeutung. Die Epithelisierung erfolgt von den Randbereichen der Wunde, in denen die Basalzellen der Epidermis verstärkt proliferieren, über den von Bindegewebe verschlossenen Defekt wachsen und sich dort zu den Zellen der mehrschichtigen Epidermis differenzieren (Gillman 1968; Newcombe 1972).

Nach einem Maximum der Zellproliferation im Wundbereich setzt die vermehrte Synthese der Interzellularsubstanz ein. Dabei soll die Synthese von Proteoglykanen der Bildung von Kollagen vorauslaufen (Dunphy u. Udupa 1955; Taylor u. Saunders 1957; Jackson, D.S. 1958). Hydroxyprolin als Indikator für die einsetzende Kollagensynthese ist in offen granulierenden Wunden in nachweisbaren Mengen ab dem dritten Tag vorhanden (Dunphy u. Udupa 1955; Grillo et al. 1958). Die Kollagensynthese steigt dann sehr rasch an, wie tracerkinetische Untersuchungen mit markiertem Prolin (Madden u. Peacock 1968; 1971; Stein u. Keiser 1971), Messung der Protokollagen-Prolin-Hydroxylase Aktivität (Mussini et al. 1967; Stein u. Keiser 1971) sowie in vitro Messungen der Kollagensynthese (Diegelmann et al. 1975) zeigten; und bleibt auch nach Stabilisierung des Kollagengehaltes im Wundgebiet über der Syntheserate der umgebenden Haut erhöht (Craig et al. 1975; Barnes et al. 1975). Es scheint auch eine qualitative Umschaltung der Kollagensynthese stattzufinden. So konnten Bailey et al. (1975) und Gabbiani et al. (1976) im subcutanen Granulationsgewebe der Ratte vermehrt Kollagen vom embryonalen Typ, Typ III Kollagen, nachweisen.

Grillo et al. (1958) untersuchten den Kollagengehalt von exzi-

dierten Hautwunden des Meerschweinchens. Der Gesamtkollagengehalt erreichte ein Maximum am 8. Tag nach Wundsetzung und fiel auf ein Minimum um den 2o. Tag ab. Die anderen Komponenten des Granulationsgewebes wurden noch schneller resorbiert, so daß die Kontraktion der Wunde durch eine ansteigende Kollagenkonzentration bei Abnahme des Gesamtkollagens gekennzeichnet war. Wenn Hautwunden beim Kaninchen mit einer Schiene künstlich für 1o Tage offen gehalten werden und man die Schienen dann entfernt, so sinkt der Kollagengehalt während der nächsten 2 Tage rapide ab (Abercombie et al. 196o); dieses Absinken wird nicht beobachtet, wenn die Schienen belassen werden (James u. Newcombe 1961). Bothwell (1964) fand während der Wundkontraktion sowohl ein Absinken der Konzentration als auch des Gehaltes an Kollagen. Bothwell postuliert, daß das Kollagen im Zentrum der Wunde angereichert und in der Peripherie resorbiert wird.
Diese Befunde, die einen hohen Stoffwechselumsatz des Kollagens in Granulationsgeweben bewiesen, führten zu einer intensiven Suche nach spezifischen kollagenspaltenden Enzymen im Wundgebiet. So konnten Grillo u. Gross (1967) eine hohe kollagenolytische Aktivität im Narbengewebe von Hautwunden des Meerschweinchens nachweisen. Epitheliales Gewebe des Wundrandes zeigte hierbei eine wesentlich höhere Aktivität als isoliertes mesenchymales Gewebe. Wenn mesenchymales und epitheliales Gewebe zusammen gezüchtet werden, so wird eine Lysis in der Nähe des Epithels sichtbar; die Lysis wird jedoch fortgesetzt, wenn das epidermale Gewebe entfernt wird. Es wird gefolgert, daß das Epithel eine Kollagenase produziert und daß mesenchymale Zellen durch eine Wechselwirkung mit dem Epithel zur Sekretion von Kollagenase angeregt werden. In späteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Enzyme von mesenchymalen und epithelialen Zellen auch unterschiedliche Eigenschaften aufweisen (Donoff et al. 1971): Das mesenchymale Enzym hat ein breiteres pH-Optimum und wird durch Cystein inhibiert, während das epitheliale Enzym sogar durch eine o,1 m Cystein-Lösung in seiner Aktivität gesteigert wird, was ein sehr ungewöhnlicher Befund für Kollagenasen von Säugetieren ist.
Die genaue Bedeutung dieser Befunde ist bis jetzt nicht geklärt. Zum einen wird sicher die Freisetzung und Migration der Epithel-

zellen durch ihre kollagenolytische Potenz erleichtert, zum anderen die Remodellierung der Narbe ermöglicht (Shoshan u. Gross 1974). Das Ergebnis der Wundheilung, die zellarme, faserreiche Narbe. scheint also wesentlich durch eine mesenchymal - epitheliale Wechselwirkung mitbeeinflußt zu sein.

C. Methoden

1. Tiermaterial

Die Versuche wurden an der Rückenhaut männlicher Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Das Körpergewicht der 27 untersuchten Tiere lag bei Versuchsbeginn bei einem Durchschnittsgewicht von 178 g (95% C.I. ±3,3 g; Max. 196 g, Min. 163 g). Sie erhielten eine standardisierte Kost und Wasser ad libitum. Sie wurden einzeln in Stoffwechselkäfigen gehalten.

2. Versuchsanordnung

Die Tiere wurden bei Versuchsbeginn randomisiert in 3 Gruppen geteilt: Bei den Tieren der Gruppe I sollte der Verlauf der Wundheilung während 3 Wochen nach Wundsetzung beobachtet werden. Je 2 Tiere wurden am 3., 5., 7., 8., 13., 17. und 21. Tag nach Wundsetzung getötet und das Narbengewebe sowie Vergleichshaut untersucht. Die Tiere der Gruppe II (7 Tiere) wurden ebenso behandelt und das Narbengewebe zu den entsprechenden Zeitpunkten zur morphologischen Untersuchung aufgearbeitet. Bei den Tieren der Gruppe III (6 Tiere) sollten jeweils die Abbauraten des neu gebildeten Kollagens am 3., 5. und 7. Tag der Wundheilung bestimmt werden. Hierzu wurde über eine Versuchsdauer von 21 Tagen bei je 2 Tieren das neu gebildete Granulationsgewebe in 3-tägigen, 5-tägigen und 7-tägigen Abständen herauspräpariert und analysiert.
Zur Bestimmung der Umsatzraten des Kollagens im Narbengewebe

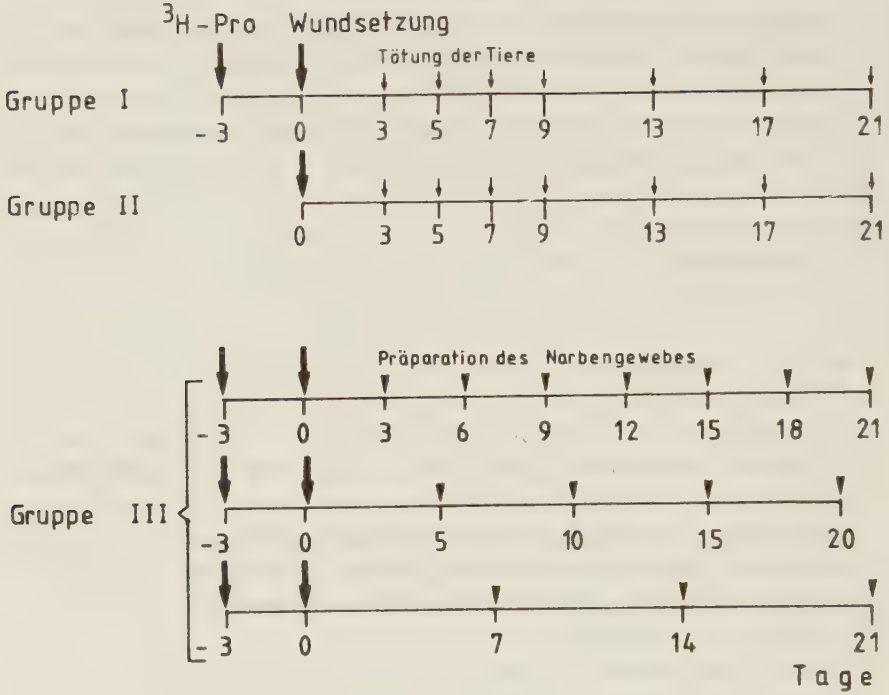

Abb. 1: Versuchsanordnung zur Bestimmung der Stoffwechselparameter des Kollagens im Narbengewebe.

erhielten die Tiere der Gruppen I u. III 3 Tage vor der Wundsetzung Tritium-markiertes Prolin. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, damit der Versuch unter den Bedingungen eines steady-state ablief und die Phase der schnellen Verteilung und Elimination des markierten Prolins abgeschlossen war (siehe hierzu die Untersuchungen von Prockop 1964; Emmrich et al. 1972; Skalicky et al. 1976, sowie die Abb. 8 u. 9).
Den allgemeinen Gang der Untersuchung sowie die Versuchsanordnung stellen die Abbildungen 1 und 2 dar.

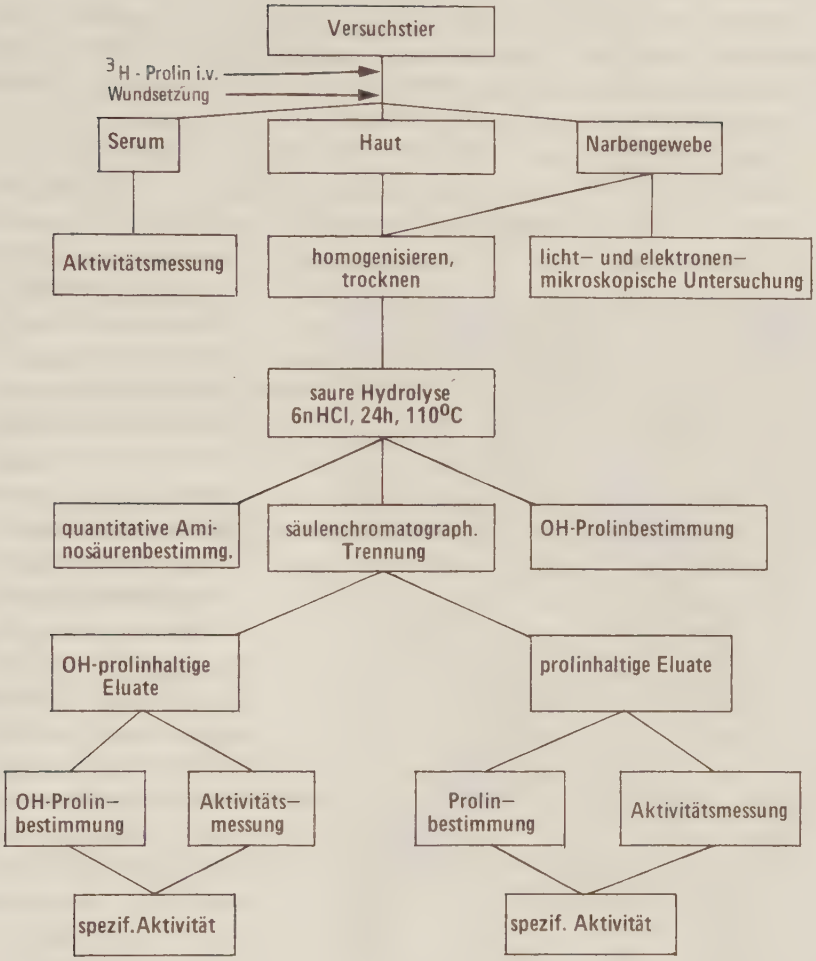

Abb. 2: Gang der Untersuchung

3. Technisches Vorgehen

Die 14 Tiere der Gruppe I und die 6 Tiere der Gruppe III erhielten bei Versuchsbeginn 355 µCi l-^{3}H-Prolin (G) (NEN) i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die spezifische Aktivität des

Präparates betrug 4797 mCi/mmol bei einer radioaktiven Konzentration von 1183,3 µCi/ml. Die Reinheit des Präparates wurde mittels Kieselgel-Dünnschichtchromatographie, Fließmittel Phenol/Wasser 75/25 + 2o mg NaCN (Pataki 1966) überprüft; es waren keine Verunreinigungen nachweisbar.

3 Tage nach Gabe des ^{3}H-Prolins erfolgte bei allen Tieren, einschließlich der 7 inaktiven Tiere der Gruppe II, die Wundsetzung: In Äthernarkose und nach Rasur der Rückenhaut wurden unter sauberen, nicht sterilen Bedingungen mit einem Locheisen (1o mm Durchmesser) durch die gedoppelte Rückenhaut im kranialen Drittel insgesamt 8 Wunden gestanzt. Je 4 Wunden lagen in zwei hintereinanderliegenden Segmenten (Abb. 3). Diese Methode, zuerst von Stein und Keiser (1971) beschrieben, erwies sich als am besten standardisierbar.

Abb. 3: Methodik der Wundsetzung

Je 2 Tiere der Gruppe I und ein Tier der Gruppe II wurden am 3., 5., 7., 9., 13., 17. und 21. Tag nach der Wundsetzung durch Entbluten getötet. Die Narben der Tiere der Gruppe I wurden unter der Prismenlupe sorgfältig von der angrenzenden Haut und der Unterlage abpräpariert und tiefgefroren für die spätere Analyse aufbewahrt; gleichzeitig wurde aus den entsprechenden Segmenten Haut entnommen, die ebenso wie die bei der Wundsetzung

gewonnene Haut von subcutanem Gewebe und Haaren befreit wurde.
Das Narbengewebe der Tiere der Gruppe II wurde sofort nach der Tötung in die modifizierte Fixationslösung nach Karnovsky eingelegt (s.u.).
In 3-tägigen, 5-tägigen und 7-tägigen Intervallen (je 2 Tiere) wurde bei den Tieren der Gruppe III unter leichter Äthernarkose das frisch gebildete Granulationsgewebe von angrenzender Haut und Unterlage subtil herauspräpariert, die Wundfläche stumpf auf die ursprüngliche Größe gespreizt und das Wundgebiet mit physiologischer NaCl-Lösung gespült. Diese Tiere wurden nach einer Versuchsdauer von insgesamt 2o bzw. 21 Tagen getötet und Vergleichshaut von Versuchsbeginn und Versuchsende ebenso wie bei Gruppe I präpariert.

4. Biochemische Untersuchungen

a. Aufarbeitung der Gewebe

Die Gewebeproben, Haut zum Zeitpunkt der Wundsetzung, Haut zum Zeitpunkt der Tötung und Granulationsgewebe der verschiedenen Zeiten, wurden gewogen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, mit einem Mikrodismembrator (Fa. Braun-Melsungen) homogenisiert, über NaOH-Plätzchen im Exsikkator getrocknet und wieder ausgewogen. Die Hydrolyse der Trockensubstanz erfolgte mit 6 n HCl in zugeschmolzenen Reagenzgläsern bei 11o°C für 24 h. Nach Einengung des Hydrolysates wurde der Rückstand in Probenverdünnungspuffer - Na-Citrat, pH 2,2 - aufgenommen und filtriert. Je ein Aliquot dieses Filtrates wurde zur quantitativen Aminosäurenbestimmung, zur quantitativen Hydroxyprolinbestimmung, zur Messung der Gesamtradioaktivität und zur säulenchromatographischen Trennung der markierten Aminosäuren verwandt.

b. Die quantitative Aminosäurenbestimmung

Die quantitative Aminosäurenbestimmung erfolgte nach dem

Prinzip der Aminosäuren-Tonenaustauscher-Chromatographie säulenchromatographisch auf sulfonierten, vernetzten Polystyren-Harzen (mod. n. Moore u. Stein 1951; 1954; siehe auch Bober 1976) mit dem Beckman-Chromatographen "Multichrom B", Harztyp M 82, Na-Citrat Methode. Die Chromatogramme wurden mit einem Integrator der Fa. Infotronics, Typ CRS-21o, durch Vergleich mit Aminosäurentestgemischen bekannter Konzentration ausgewertet. Die Variationskoeffizienten des methodischen Fehlers wurden bei insgesamt 16 Eichanalysen ermittelt; sie betrugen 4,5% bei Asparaginsäure, 3,9% bei Glutaminsäure, 4,o% bei Prolin und 3,7% bei Hydroxylysin.

c. Die säulenchromatographische Isolierung der markierten Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin

Die markierten Aminosäuren Hydroxyprolin und Prolin wurden ebenso säulenchromatographisch auf sulfonierten, vernetzten Polystyren-Harzen (mod. n. Moore u. Stein 1951; 1954) isoliert. Hierzu wurde bei dem Aminosäurenanalyzer "Unichrom" der Fa. Beckman das Detektorsystem (Ninhydrinzufluß und Photometer) umgangen und das Säuleneluat direkt einem volumengesteuerten Fraktionssammler (Fa. LKB) zugeleitet. Die Trennungsbedingungen waren wie folgt: Säule o,9 cm Durchmesser, Harztyp M 72, Füllhöhe 55 cm, Temperatur 55°C, Puffer 1: pH 2,93 + 4% Methanol - o,2 n - Na-Citrat, Puffer 2: pH 3,62 - o,2 n - Na-Citrat, Pufferwechsel nach 64 min, Pufferdurchfluß 68 ml/h (Abb. 4). Die Wiederfindungsrate des aufgetragenen Hydroxyprolins betrug 72%. Die einzelnen Aminosäuren verteilten sich auf durchschnittlich 3 - 5 Fraktionen zu je 2 ml.

d. Die quantitative Hydroxyprolinbestimmung

Hydroxyprolin wurde sowohl in den Hydrolysaten der Gewebeproben als auch in den Hydroxyprolin-haltigen Eluaten nach Säulentrennung photometrisch nach Oxydation mit Natriumperoxyd zum Pyrrol und Bildung eines roten Farbstoffs mit p-Dimethyl-

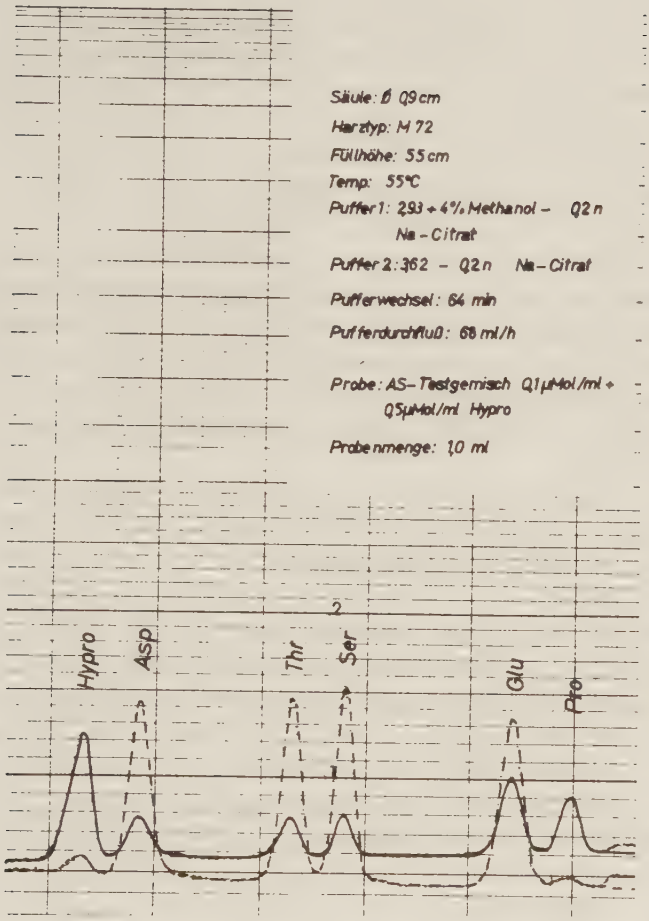

Abb. 4: Säulenchromatographische Trennung der Aminosäuren mit der "Unichrom"- Apparatur

aminobenzaldehyd nach der Methode von Neumann und Logan (1950), modifiziert durch die Methode von Martin und Axelrod (1953), bestimmt.

Einer Beeinflussung der Reaktion durch unterschiedliche Salzkonzentrationen bzw. pH-Veränderungen des Probenansatzes wurde durch jeweils identische Ansätze mit bekannten Standardlö-

sungen begegnet. Der Variationskoeffizient dieser Methode betrug 1,1%. Im Untersuchungsbereich (2 - 2o µg Hyp) erwies sich die Methode auch bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen als linear.

e. Die quantitative Prolinbestimmung

Die Prolinkonzentration in Säuleneluaten wurde durch Rechromatographie am"Multichrom B" der Fa. Beckman bestimmt. Diese Methode erwies sich mit einem Variationskoeffizienten von 4,3% als am vorteilhaftesten, da die Ninhydrinreaktion hier immer unter völlig gleichen Bedingungen abläuft; zugleich werden Verunreinigungen der Eluate mit anderen Aminosäuren sichtbar.

f. Die Radioaktivitätsmessung

Die Radioaktivitätsmessungen erfolgten mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler "Tri-Carb-Spectrometer" Typ 2425 der Fa. Packard. Als Szintillatoren dienten Aquasol^{R} (NEN) zur Messung der Gesamtradioaktivität im Serum und Toluol-Szintillator + 2o% BBS-3 (Sample-Solubilizer der Fa. Packard) für alle übrigen Bestimmungen. Die Ausbeute betrug 32% für den Toluol-Szintillator und 37% für Aquasol bei Messung von ^{3}H-Standards bekannter Radioaktivität. Eine Quenchkorrektur brauchte nicht zu erfolgen, da alle Proben hinsichtlich ihres Wassergehaltes und ihrer Salzkonzentration identisch angesetzt wurden; als Kontrolle dienten gleichzeitige Messungen des externen Standard-Kanal-Verhältnisses. Es wurden nur Proben berücksichtigt, deren Radioaktivität mindestens das 4-fache des Leerwerts betrug.

5. Berechnungen und Ergebnisdarstellung

Die bei den Untersuchungen gewonnenen Rohdaten wurden auf Lochkarten übertragen und mit einem Computer "CD CYBER 7214" (Zentraleinrichtung für Datenverarbeitung der FU Berlin) weiterverarbeitet. Alle Datenmodifikationen und statistischen Prozeduren erfolgten mit dem Programmsystem "SPSS", Programmversion 6 (Nie et al. 1975).

Aminosäurenkonzentrationen wurden als µmol AS/mg TS bzw. %µmol errechnet; als Einheit für Radioaktivitätsmessungen diente dpm/µmol AS bzw. dpm/mg TS. Als Gütemaß wurde für jeden Mittelwert für $n \geq 3$ das 95% - Vertrauensintervall (95% C.I.) angegeben; für n=2 erfolgte die Angabe als $\bar{x} \pm (Max - \bar{x})$ bzw. $(\bar{x} - Min)$.

Der Vergleich der Aminosäurenkonzentrationen in der Haut bei Versuchsbeginn und Versuchsende sowie der spezifischen Aktivitäten und der Gesamtaktivität erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen. Mehrere unabhängige Stichproben, z.B. die Aminosäurenkonzentrationen im Narbengewebe, wurden mittels des H-Tests von Kruskal und Wallis (nicht parametrische Varianzanalyse) bezüglich signifikanter Unterschiede getestet.

Um den Grad einer Korrelation zwischen zwei Meßreihen zu prüfen, wurde als verteilungsfreies Abhängigkeitsmaß der Spearman'sche Rangkorrelationskoeffizient (r_s) ermittelt.

Zeitabhängige Veränderungen der verschiedenen Variablen wurden graphisch dargestellt; bei Kurven, die dem Verlauf einer Hyperbel ähnelten, wurde mittels ln-Linearisierung eine e-Funktion angepaßt und hieraus die Halbwertszeiten sowie die Turnoverraten bestimmt (Koblet 1971). Für jede so erhaltene Regressionsgerade (logarithmische Form der e-Funktion) wurde als Gütemaß der Standardfehler der Schätzung ($s_{y.x}$) ermittelt. Dieses Vorgehen erscheint unter Betonung des Modellcharakters der Untersuchungen als gerechtfertigt, auch wenn die statistischen Voraussetzungen für die Durchführung einer Regressionsanalyse, nämlich normalverteilte Meßdaten, nicht immer gegeben waren.

Der Vergleich des Steigungsmaßes zweier Regressionsgeraden erfolgte nach vorheriger Überprüfung der Gleichheit der Rest-

varianzen nach

$$t = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s^2_{y1.x1}\cdot(n_1-2) + s^2_{y2.x2}\cdot(n_2-2)}{n_1+n_2-4} \cdot \left[\frac{1}{Q_{x1}} + \frac{1}{Q_{x2}}\right]}}$$

durch Vergleich mit den Student'schen t-Werten für n_1+n_2-4 Freiheitsgraden.
Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p > 0{,}05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) gewertet.

6. Morphologische Untersuchungen

Das von anhängendem Gewebe freipräparierte Narbengewebe wurde in ca. 2 mm große Stücke zerteilt und sofort in die modifizierte Fixationslösung nach Karnovsky (Graham u. Karnovsky 1966) - 3% Paraformaldehyd und 3% Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer, pH 7,4 - eingelegt; die Nachfixierung erfolgte mit 1%-iger Osmiumsäure. Nach dem Auswaschen der Fixierlösung und dem Entwässern in der Acetonreihe wurde das Gewebe in Mikropal^{R} (Fa. Ferak) eingebettet. Ein Teil der Gewebestücke wurde zusätzlich auf der Stufe des 75%igen Acetons mit Phosphorwolframsäure kontrastiert. Die Schnitte wurden an einem Ultrotom (Fa. LKB, Stockholm) hergestellt. Nach Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat wurden die Schnitte mit einem Zeiss - Elektronenmikroskop, Typ EM 10, untersucht und ausgewertet.

D.Ergebnisse

1. Die Aminosäurenzusammensetzung der Haut und des Narbengewebes

Aminosäurenanalysen wurden durchgeführt vom Narbengewebe des 3., 5., 7. (jeweils n = 4), 9., 13., 17. und 21. (jeweils n = 2) Tages nach Wundsetzung sowie von der präparierten Haut bei Wundsetzung (n = 2o) und bei Tötung der Tiere (n = 2o). Die zusammengefaßten Ergebnisse mit den Angaben in µmol AS/mg TS sowie dem 95% Vertrauensintervall für jeden Wert zeigt die Tabelle 1. Die Angaben für die Haut stellen den Mittelwert aller Analysen, Haut bei Wundsetzung und Haut bei Tötung, dar, wobei zuvor mittels des Wilcoxon Paarvergleichs für abhängige Stichproben auf dem 5% Niveau keine signifikanten Unterschiede gefunden werden konnten.
Für alle so ermittelten Aminosäurenkonzentrationen des Narben-

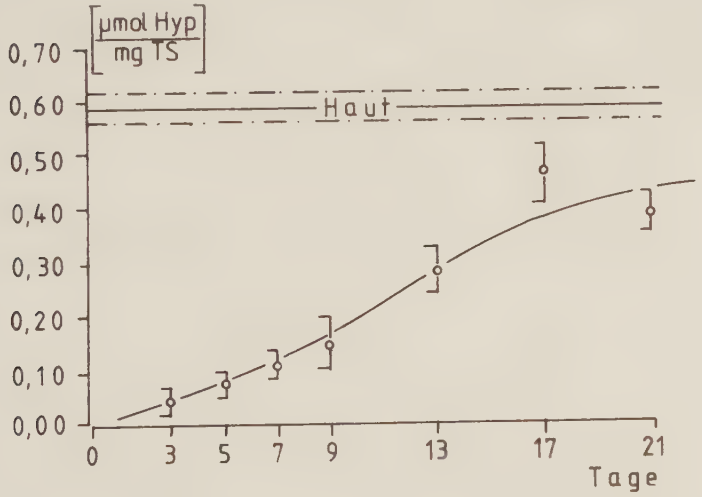

Abb. 5: Verlauf der Hydroxyprolinkonzentration im Narbengewebe. Der Hydroxyprolingehalt der Haut mit dem 95% C.I. ist markiert. (Abszisse: Tage nach Wundsetzung; Ordinate: Hydroxyprolinkonzentration)

	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met
3. Tag	0,457 ±0,018	0,318 ±0,017	0,368 ±0,014	0,525 ±0,021	0,315 ±0,016	0,481 ±0,073	0,433 ±0,013	0,183 ±0,023	0,363 ±0,022	0,089 ±0,011
5. Tag	0,441 ±0,025	0,304 ±0,020	0,330 ±0,018	0,508 ±0,027	0,333 ±0,020	0,544 ±0,089	0,427 ±0,022	0,129 ±0,030	0,337 ±0,025	0,083 ±0,012
7. Tag	0,410 ±0,048	0,271 ±0,031	0,305 ±0,034	0,483 ±0,052	0,325 ±0,027	0,538 ±0,133	0,398 ±0,047	0,102 ±0,019	0,294 ±0,046	0,074 ±0,009
9. Tag	0,313 ±0,037	0,208 ±0,028	0,233 ±0,026	0,381 ±0,020	0,304 ±0,004	0,444 ±0,034	0,316 ±0,022	0,081 ±0,009	0,221 ±0,034	0,060 ±0,019
13.Tag	0,458 ±0,023	0,265 ±0,020	0,341 ±0,009	0,573 ±0,002	0,455 ±0,022	0,833 ±0,079	0,524 ±0,001	0,096 ±0,052	0,301 ±0,027	0,087 ±0,043
17.Tag	0,435 ±0,020	0,240 ±0,011	0,354 ±0,031	0,589 ±0,044	0,542 ±0,010	1,281 ±0,039	0,549 ±0,018	0,045 ±0,001	0,254 ±0,003	0,046 ±0,013
21.Tag	0,384 ±0,001	0,193 ±0,008	0,348 ±0,001	0,531 ±0,009	0,500 ±0,022	1,171 ±0,115	0,505 ±0,023	0,055 ±0,036	0,216 ±0,002	0,061 ±0,026
p	<0,05	<0,005	n.s.	<0,05	<0,01	<0,01	<0,005	<0,001	<0,005	n.s.
r_s	-0,45	-0,70	-0,18	-0,03	+0,43	+0,57	+0,16	-0,78	-0,69	-0,38
Haut	0,352 ±0,010	0,162 ±0,006	0,308 ±0,012	0,510 ±0,015	0,670 ±0,023	1,704 ±0,056	0,633 ±0,024	0,014 ±0,007	0,162 ±0,011	0,041 ±0,005

Tab. 1: Aminosäurenzusammensetzung des Narbengewebes und der präparierten Haut; Angaben in µmol AS/mg TS ± 95% C.I.; p = Signifikanzniveau beim H-Test von KRUSKAL und WALLIS; r_s = SPEARMAN'scher Rangkorrelationskoeffizient

	Ile	Leu	Tyr	Phe	Hyl	Lys	His	Arg	Hyp
3. Tag	0,204 ±0,009	0,379 ±0,016	0,193 ±0,017	0,234 ±0,016	0,005 ±0,001	0,335 ±0,013	0,164 ±0,014	0,264 ±0,009	0,052 ±0,020
5. Tag	0,191 ±0,010	0,360 ±0,022	0,181 ±0,020	0,220 ±0,016	0,009 ±0,002	0,327 ±0,017	0,157 ±0,018	0,263 ±0,014	0,076 ±0,016
7. Tag	0,177 ±0,016	0,340 ±0,042	0,149 ±0,029	0,216 ±0,023	0,011 ±0,003	0,304 ±0,039	0,135 ±0,020	0,248 ±0,023	0,106 ±0,020
9. Tag	0,139 ±0,014	0,261 ±0,013	0,115 ±0,020	0,141 ±0,020	0,010 ±0,001	0,233 ±0,012	0,098 ±0,005	0,204 ±0,010	0,149 ±0,052
13.Tag	0,190 ±0,001	0,369 ±0,030	0,127 ±0,031	0,185 ±0,019	0,022 ±0,019	0,334 ±0,023	0,118 ±0,020	0,298 ±0,007	0,278 ±0,038
17.Tag	0,173 ±0,009	0,324 ±0,017	0,090 ±0,009	0,163 ±0,012	0,045 ±0,004	0,290 ±0,009	0,090 ±0,001	0,315 ±0,009	0,472 ±0,063
21.Tag	0,146 ±0,003	0,281 ±0,001	0,087 ±0,012	0,141 ±0,001	0,033 ±0,001	0,242 ±0,003	0,074 ±0,002	0,305 ±0,008	0,386 ±0,022
p	<0,005	<0,05	<0,005	<0,005	<0,005	<0,01	<0,005	<0,005	<0,001
r_s	-0,70	-0,57	-0,68	-0,65	+0,67	-0,52	-0,68	+0,21	+0,75
Haut	0,098 ±0,008	0,228 ±0,007	0,051 ±0,004	0,108 ±0,004	0,038 ±0,002	0,221 ±0,005	0,057 ±0,003	0,326 ±0,009	0,587 ±0,023

Fortsetzung der Tabelle 1 (S. 30)

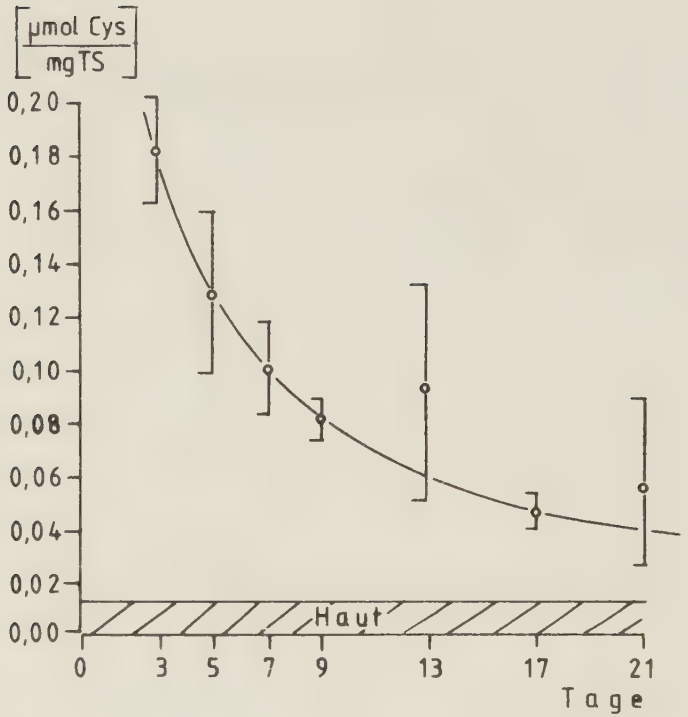

Abb. 6: Verlauf der Cysteinkonzentration im Narbengewebe; schraffiert der Kontrollwert der Haut. (Abszisse: Tage nach Wundsetzung; Ordinate: Cysteinkonzentration)

gewebes wurde zwischen den einzelnen Gruppen ein H-Test nach Kruskal und Wallis durchgeführt. Nicht signifikante Unterschiede lagen lediglich bei den Aminosäuren Methionin und Serin vor. Der Grad der Abhängigkeit der Aminosäurenkonzentrationen von der Zeit nach Wundsetzung wurde mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman bestimmt. Eine deutliche zeitliche Zunahme zeigen Glyzin (r_s = o,57), Hydroxylysin (r_s = o,67) und Hydroxyprolin (r_s = o,75); eine zeitliche Abnahme (negative Korrelation) Threonin (r_s = -o,7o), Cystein (r_s = -o,78),

Valin (r_s = -o,69), Isoleuzin (r_s = -o,7o), Tyrosin (r_s = -o,68) und Histidin (r_s = -o,68). Das Signifikanzniveau der angegebenen Korrelationskoeffizienten beträgt jeweils p = o,oo1.
Die graphische Darstellung der Aminosäurenkonzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit zeigt für die Aminosäuren mit positiver Korrelation den typischen Verlauf einer Sättigungskurve mit raschem Anstieg und langsamem Annähern an den entsprechenden Wert der Haut (Abb. 5). Die Aminosäuren mit negativer Korrelation weisen eine Phase des raschen Abfalls und ein langsames Annähern an den Wert der Haut auf (Abb. 6).
Der ermittelte Hydroxylierungsgrad der Aminosäuren Prolin und Lysin weist eine gute Korrelation mit der Zeit auf (Pro : Hyp: r_s=-o,74; Lys : Hyl: r_s=-o,71). Der zeitliche Verlauf gleicht dem der Aminosäuren mit negativer Korrelation. Die Werte sowie den prozentualen Anteil von einigen, für das Kollagen typischen Aminosäuren zeigt die Tabelle 2. In Abbildung 7 ist der Verlauf des Gesamthydroxyprolins pro Narbe als Maß für den Gesamtkollagengehalt pro Narbe dargestellt. Die Kurve erreicht ein Maximum um den 5. Tag und fällt kontinuierlich bis zum Versuchsende ab.

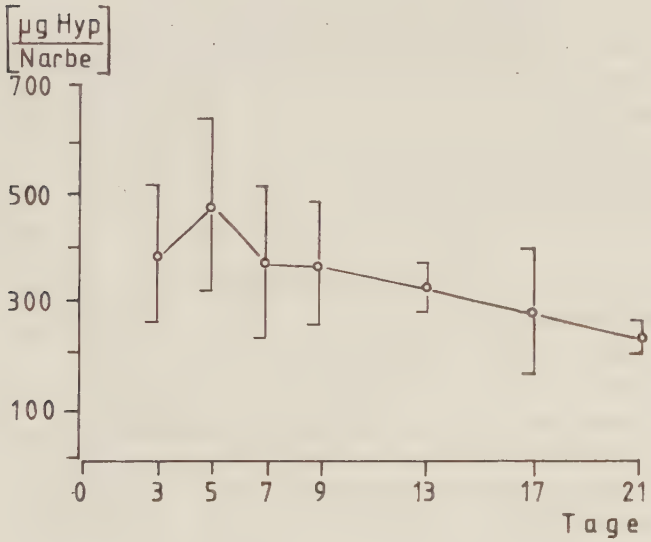

Abb. 7: Zeitlicher Verlauf des Gesamthydroxyprolins im Narbengewebe als Maß für den Gesamtkollagengehalt

	Pro:Hyp	Lys:Hyl	Gly	Pro	Hyp
3. Tag	1o,53 ±4,41	8o,44 ±2o,27	9,44 ±1,47	6,15 ±o,18	1,o3 ±o,41
5. Tag	4,93 ±1,68	4o,65 ±8,83	1o,85 ±1,25	6,62 ±o,15	1,51 ±o,3o
7. Tag	3,12 ±o,52	28,66 ±7,76	11,3o ±2,o7	6,88 ±o,41	2,26 ±o,45
9. Tag	2,34 ±o,84	23,55 ±3,59	11,57 ±1,31	7,9o ±o,19	3,91 ±1,49
13.Tag	1,66 ±o,15	7,61 ±3,34	14,3o ±1,61	7,81 ±o,51	4,78 ±o,73
17.Tag	1,17 ±o,18	6,55 ±o,8o	19,85 ±o,71	8,4o ±o,11	7,33 ±1,o1
21.Tag	1,3o ±o,o2	7,34 ±o,34	2o,39 ±1,66	8,73 ±o,53	6,73 ±o,49
p	o,oo1	o,oo1	--	--	--
r_s	-o,74	-o,71	--	--	--
Haut	1,14 ±o,o9	5,93 ±o,34	26,49 ±o,58	1o,46 ±o,32	9,46 ±o,36

Tab. 2: Hydroxylierungsgrad der Aminosäuren Prolin und Lysin im Narbengewebe und in der Haut. Die Spalten 3 bis 5 zeigen den prozentualen Anteil der Aminosäuren Glyzin, Prolin und Hydroxyprolin (entsprechend Reste pro 1oo Reste) im Narbengewebe und in der Haut mit dem 95% C.I.; p = Signifikanzniveau beim H-Test von KRUSKAL und WALLIS; r_s = SPEARMAN'scher Rangkorrelationskoeffizient.

2. Morphologische Befunde des Wundheilungsprozesses

Schon am 3. Tag nach Wundsetzung sind im Granulationsgewebe fertig ausdifferenzierte Fibroblasten nachweisbar (Abb. I)[x]. Elekronenmikroskopisch stellen sich die Fibroblasten als bipolare Zellen dar, deren Fortsätze plump und oft abgerundet sind (Abb. V). Sie lassen sich durch ihre Gestalt und ihren Reichtum an Membranen des rauhen endoplasmatischen Retikulums leicht von den anderen Zellen des Granulationsgewebes unterscheiden. Das endoplasmatische Retikulum der Fibroblasten besteht aus membranbegrenzten, unregelmäßig geformten Hohlräumen, die große Teile des Zytoplasmas ausfüllen und ineinander übergehen. Die Membranen sind an ihrer Außenseite kettenförmig mit elektronendichten Granula besetzt. In den Hohlräumen ist ein feingranuläres, wenig elektronendichtes Material erkennbar. Das rauhe endoplasmatische Retikulum ist gleichmäßig über das ganze Zytoplasma verteilt (Abb. I, V, VIII, IX, X und XII). Zum Teil stellen sich die Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums sackförmig erweitert dar (Abb. V).
Der Golgiapparat besteht aus 3 - 4 Doppellamellenpaaren mit einer ringsherum liegenden vesikulären Komponente (Abb. VIII und IX). Die Mitochondrien sind rund, oval oder langgestreckt; die cristae mitochondriales sind von unterschiedlicher Länge und Form (Abb. I, VIII und X). Der Kern der Fibroblasten ist groß, oval und zeigt eine Anhäufung granulärer Elemente in den Randgebieten (Abb. V und IX).
Neben diesen Strukturen stellen sich in einigen Fibroblasten Mikrotubuli und feine Filamente im Zytoplasma dar (Abb. VI und IX); zum Teil füllen die Filamente große Teile des Zytoplasmas aus und sind gebündelt (Abb. XIII). Die Abbildungen IX und XII zeigen in Fibroblastenfortsätzen membranbegrenzte Einschlüsse, in denen quergestreifte kollagene Fibrillen nachweisbar sind. Der äußeren Zellmembran der Fibroblasten sitzt zum Teil ein wolkiges, fein filamentäres Material auf (Abb. VI und XII).

Neben den Fibroblasten können auch die anderen typischen zellu-

[x] Die elektronenmikroskopischen Abbildungen I bis XVI siehe im Anhang Seite 61 - 93

lären Bestandteile eines Granulationsgewebes nachgewiesen werden. So zeigen die Abbildungen I, VII und XV typische Monozyten mit großem, nierenförmigem, gelapptem Kern, der etwas exzentrisch liegt; im Zytoplasma sind große Mitochondrien und Vakuolenbildungen, die Oberfläche ist unruhig mit zum Teil anliegenden Zellfortsätzen. Die Histiozyten zeigen einen kleineren Kern, zahlreiche Granula und Vakuolen sowie große Mengen von Mitochondrien im Zytoplasma; die Oberfläche weist ausgeprägte Fortsatzbildungen auf (Abb. II). In Abbildung XIV sind neue Kapillarsprossen dargestellt, ein Lymphozyt in Abbildung II. Eine Fibroblastenvorstufe mit erst wenig rauhem endoplasmatischen Retikulum ist in Abbildung I angeschnitten.

Im Extrazellulärraum sind zu allen Zeiten der Wundheilung kollagene Einzelfibrillen und Fibrillenbündel nachweisbar. Die Fibrillen weisen eine typische Querstreifung mit einer Periodik von ca. 2o - 3o nm auf; zwischen den Hauptperioden liegen feinere Unterperioden (Abb. XVI). Der Fibrillendurchmesser ist nicht einheitlich und schwankt zwischen 3o und 4o nm (Abb. III und XVI). Die Fibrillen liegen zum Teil einzeln und ungeordnet (Abb. I und XI) oder gebündelt und ausgerichtet (Abb. III und XVI). Daneben finden sich im Extrazellulärraum noch feinere Filamente ohne Querstreifung wechselnden Durchmessers (ca. 1o nm) und ein fein granuläres Material.

3. Der Verlauf der spezifischen Aktivitäten und der Gesamtaktivitäten in Haut und Serum

Die Gesamtradioaktivität im Serum wurde jeweils bei Tötung der Versuchstiere gemessen. Die ermittelten Werte enthält die Tabelle 3. Bei der graphischen Darstellung zeigte sich ein typischer, einphasiger Verlauf in Form einer Hyperbel (siehe Abb. 8, semilogarithmische Darstellung); durch ln-Linearisierung wurde die lineare Regressionsgerade geschätzt:

$\ln y = 14{,}914 - 0{,}121\ x;\ r = -0{,}98;\ s_{y.x} = 0{,}151$

Die hieraus ermittelte Turnoverrate beträgt 12,1% pro Tag, die Halbwertszeit 5,7 Tage.

Tage n. ^{3}H-Pro	Gesamtakt. im Serum [dpm/ml] · 10^6	Gesamtakt. in der Haut [dpm/mg TS]	Spez. Akt. des Pro [dpm/µmol Pro]	Spez. Akt. des Hyp [dpm/µmol Hyp]
3	-----	10278,3 ±1387,0	12016,3 ±3018,8	5776,2 ±558,5
6	1,550 ±0,114	8656,5 ±1288,4	10250,8 ±1859,8	5346,4 ±1108,9
8	1,430 ±0,121	8618,2 ±1473,0	9272,0 ±2019,0	5748,9 ±708,7
10	0,778 ±0,089	7309,5 ±89,6	7730,3 ±81,4	5372,7 ±371,6
12	0,654 ±0,031	6982,7 ±399,9	6917,4 ±1698,7	4932,6 ±571,6
16	0,411 ±0,017	6619,8 ±326,8	5894,5 ±139,9	4644,1 ±467,3
20	0,255 ±0,019	6809,0 ±680,9	5836,2 ±37,4	5266,8 ±231,7
24	0,187 ±0,001	6506,3 ±441,5	5330,4 ±152,9	4510,0 ±482,3
r_s	-0,98	-0,70	-0,82	-0,35
Elimin.-Gleich.	$y=2,9\cdot10^6\cdot e^{-0,121x}$	$y=9411,6\cdot e^{-0,018x}$	$y=12130,5\cdot e^{-0,04x}$	$y=5648,5\cdot e^{-0,007x}$
HWZ	5,7 Tage	38,5 Tage	17,4 Tage	99 Tage

Tab. 3: Gesamtaktivitäten in Haut und Serum sowie spezifische Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin in der Haut; zusätzlich Angabe der Eliminationsgleichung, der Halb-

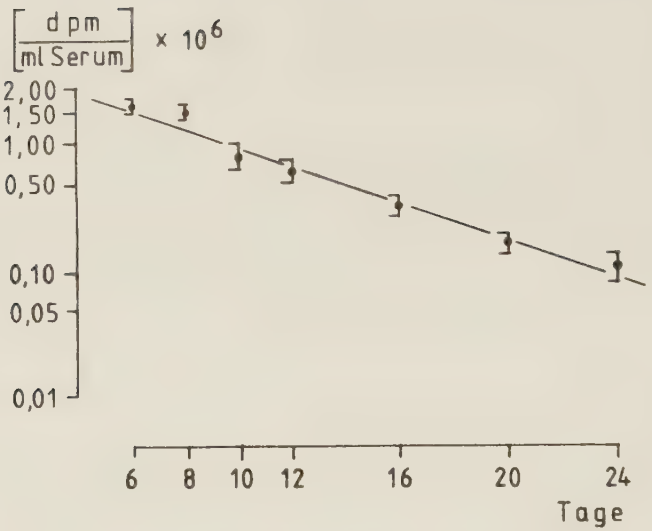

Abb. 8: Verlauf der Gesamtaktivität im Serum. (Abszisse: Tage nach Gabe von ^{3}H-Prolin; Ordinate: logarithmische Auftragung der Aktivität)

Am 6. Tag nach Gabe von 355 µCi ^{3}H-Prolin wurden o,69 µCi/ml Serum (= o,2%) gemessen, am 24. Tag nach Gabe o,o8 µCi/ml Serum (= o,o2%).

Die Gesamtaktivitäten sowie die spezifischen Aktivitäten der Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin in der Haut wurden jeweils bei Wundsetzung und bei Tötung der Tiere ermittelt. Ein Wilcoxon Test für gepaarte, abhängige Stichproben ergab für alle Parameter signifikante Unterschiede ($p < o,o5$). Die Werte sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.
Die auch hier durchgeführten Regressionsanalysen nach ln-Linearisierung ergaben:

für die Gesamtaktivität
$\ln y = 9,15o - o,o18\ x$; $r = -o,7o$; $s_{y.x} = o,128$

Turnoverrate = 1,8% pro Tag; Halbwertszeit = 38,5 Tage

für die spezifische Aktivität des Prolins

$\ln y = 9{,}404 - 0{,}040\ x$; $r = -0{,}82$; $s_{y.x} = 0{,}177$

Turnoverrate = 4,0% pro Tag; Halbwertszeit = 17,4 Tage

für die spezifische Aktivität des Hydroxyprolins

$\ln y = 8{,}639 - 0{,}007\ x$; $r = -0{,}35$; $s_{y.x} = 0{,}135$

Turnoverrate = 0,7% pro Tag; Halbwertszeit = 99 Tage

Den Verlauf der spezifischen Aktivitäten der Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin zeigt die Abbildung 9. Der geringe Abfall der spezifischen Radiomarkierung des Hydroxyprolins als Ausdruck der Umsatzgeschwindigkeit der stoffwechselpassiven Kollagenfraktion in der Haut kommt deutlich zum Ausdruck, während der steilere Abfall der spezifischen Aktivität des Prolins auch den Umsatz nicht kollagenen Eiweißes wiederspiegelt. Der

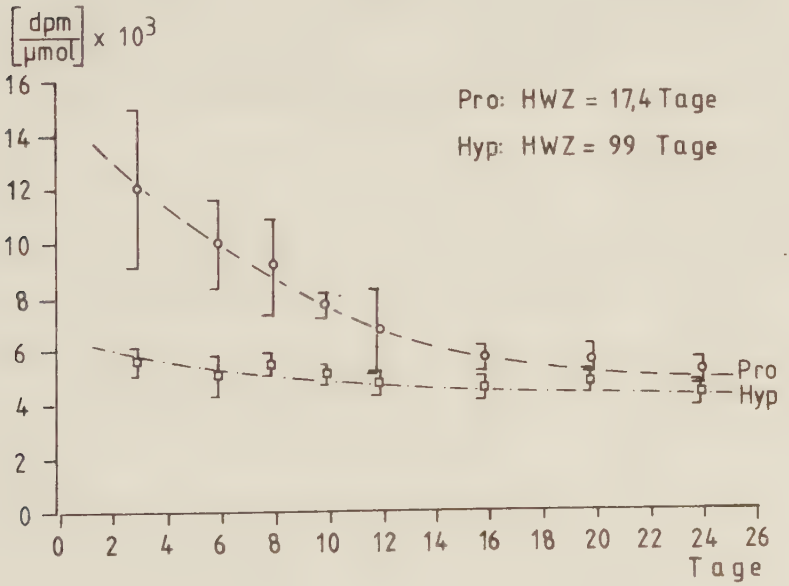

Abb. 9: Verlauf der spezifischen Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin in der Haut nach Gabe von ^{3}H-Prolin. (Abszisse: Tage nach Gabe von ^{3}H-Prolin; Ordinate: Spezifische Aktivität)

Verlauf der Gesamtaktivität mit einer mittleren Halbwertszeit ist als Summation aller Umsatzraten aufzufassen. Gegen Versuchsende ist für die spezifischen Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin etwa ein Verhältnis von 1 : 1 erreicht.

4. Befunde zum Kollagenumsatz im Narbengewebe

a. Narbengewebe des 3. bis 21. Tages

Die ermittelten Daten im Narbengewebe des 3. - 21. Tages, Gesamtaktivität und spezifische Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin, sind in Tabelle 4 aufgeführt. Der zeitabhängige Verlauf der Gesamtaktivität und der spezifischen Aktivität des Prolins folgte wieder angenähert einer Hyperbel. Die linearisierten Eliminationsgleichungen ergaben sich wie folgt:

für die Gesamtaktivität
$\ln y = 1o{,}348 - o{,}1o5\ x$; $r = -o{,}95$; $s_{y.x} = o{,}2o1$
Turnoverrate = 1o,5% pro Tag; Halbwertszeit = 6,6 Tage

für die spezifische Aktivität des Prolins
$\ln y = 11{,}931 - o{,}171\ x$; $r = -o{,}97$; $s_{y.x} = o{,}241$
Turnoverrate = 17,1% pro Tag; Halbwertszeit = 4,1 Tage

Prolin weist auch hier wieder als Ausdruck der raschen Verstoffwechselung eine größere Turnoverrate auf als die Gesamtaktivität.
Der zeitabhängige Verlauf der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins läßt drei Phasen unterscheiden (siehe Abb. 1o): eine erste langsame Phase (angenäherte Parallelität zur Abszisse) vom 3. bis 7. Tag nach Wundsetzung, eine zweite Phase des schnellen Abfalls vom 7. bis 18. Tag und eine dritte Phase des wieder langsameren Abfalls bis zum Versuchsende (21. Tag). Die Verlaufskurve der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins im Narbengewebe des 3. bis 21. Tages wird dadurch verfälscht, daß eine ständige Verdünnung der spezifischen Aktivität durch die starke Kollagenkumulation stattfindet. Um diesen Fehler auszuschließen wurde die gesamte, im Hydroxyprolin vorhandene Radioaktivität berechnet: dpm Hyp/mg TS der Narbe.

	Gesamtaktivität [dpm/mg TS]	Spez. Akt. des Pro [dpm/µmol Pro]	Spez. Akt. [dpm/µmol Hyp]	$\left[\frac{\text{dpm Hyp}}{\text{mg TS}}\right]$	$\left[\frac{\text{µg Hyp}}{\text{mg TS}}\right]$	$\left[\frac{\text{µg Hyp}}{\text{Narbe}}\right]$
3. Tag	16259,0 ±1307,4	52965,1 ±9010,8	7125,0 ±1350,0	472,8 ±83,1	6,81 ±2,63	395,2 ±135,6
5. Tag	16740,0 ±4141,6	47443,8 ±8852,8	7235,0 ±1578,1	572,1 ±143,5	9,92 ±1,99	481,9 ±167,2
7. Tag	10358,6 ±1718,7	27356,5 ±5422,0	8236,1 ±1332,9	867,1 ±126,5	13,85 ±2,05	387,1 ±138,2
9. Tag	7582,9 ±1214,9	18470,3 ±4872,8	7481,0 ±434,5	1088,8 ±322,7	19,49 ±6,80	383,6 ±123,5
13.Tag	4622,3 ±397,3	7521,3 ±427,3	4485,1 ±477,9	1230,4 ±36,0	36,50 ±4,94	333,6 ±43,5
17.Tag	4241,6 ±218,1	4170,8 ±240,5	3575,3 ±324,2	1409,2 ±532,9	61,95 ±8,21	281,4 ±128,3
21.Tag	2769,7 ±86,7	3359,5 ±86,7	2876,1 ±134,2	1111,7 ±114,2	50,85 ±3,15	244,2 ±3,80
r_s	-0,93	-0,95	-0,62	--	+0,75	--
Elimin. -Gleich.	$y=31203,0 \cdot e^{-0,105x}$	$y=151942,9 \cdot e^{-0,171x}$	--	--	--	--
HWZ	6,6 Tage	4,1 Tage	--	--	--	--

Tab. 4: Gesamtaktivität, spezifische Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin, Radioaktivität im Hydroxyprolin, Hydroxyprolinkonzentration sowie Gesamthydroxyprolin im Narbengewebe des 3. - 21. Tages; zusätzlich Angabe der Eliminationsgleichung, der Halbwertszeit und des SPEARMAN'schen Korrelationskoeffizienten.

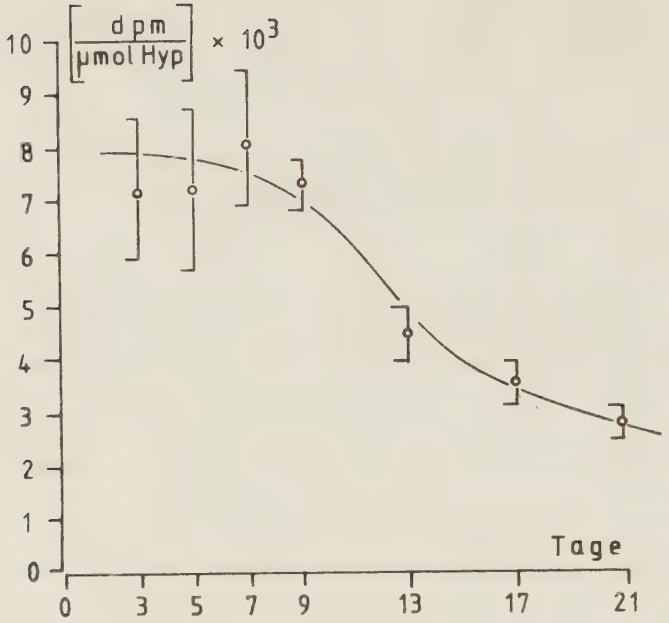

Abb. 1o: Verlauf der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins im Narbengewebe des 3. - 21. Tages. (Abszisse: Tage nach Wundsetzung; Ordinate: spezifische Aktivität des Hydroxyprolins)

Diese Größe zeigt folgenden Verlauf (Abb. 11): Die Radioaktivität steigt zunächst bis zum ca. 15. Tag nach Wundsetzung an, erreicht hier ein Maximum, um dann bis zum Versuchsende wieder abzufallen. In die Abbildung 11 ist gleichzeitig der Verlauf der Hydroxyprolinkonzentration als Maß für die Kollagenkumulation eingezeichnet. Hierbei wird deutlich, daß die beiden Kurven bis zum ca. 7. Tag nur sehr geringfügig voneinander abweichen (als Ausdruck des geringgradigen Abbaus), während anschließend hieran die Kurven bis zum Versuchsende immer stärker auseinander laufen (als Ausdruck des sich verstärkenden Abbaus).

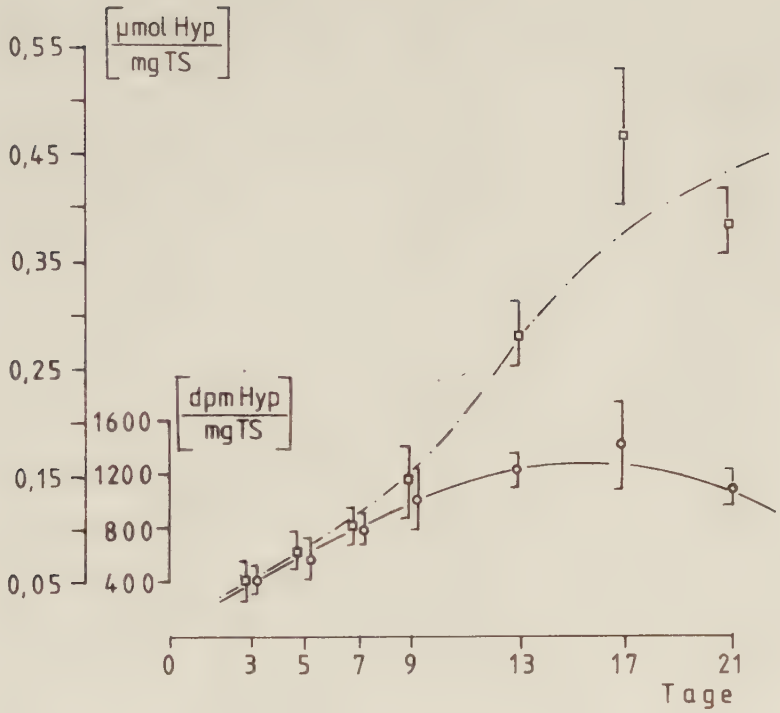

Abb. 11: Verlauf der im Hydroxyprolin gefundenen Radioaktivität im Narbengewebe des 3. - 21. Tages (untere Kurve); zum Vergleich ist der Verlauf der Hydroxyprolinkonzentration eingezeichnet (obere Kurve).

b. Umsatzraten im Narbengewebe des 3., 5. und 7. Tages

Die spezifischen Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin sowie die Gesamtaktivitäten des in 3-tägigen, 5-tägigen und 7-tägigen Intervallen herauspräparierten Narbengewebes sind in den Tabellen 5 bis 7 zusammengefaßt.
Der Abfall der Gesamtaktivität in den 3 Untergruppen wurde wieder mathematisch durch linearisierte Eliminationsgleichungen beschrieben (für den graphischen Verlauf siehe Abb. 12):

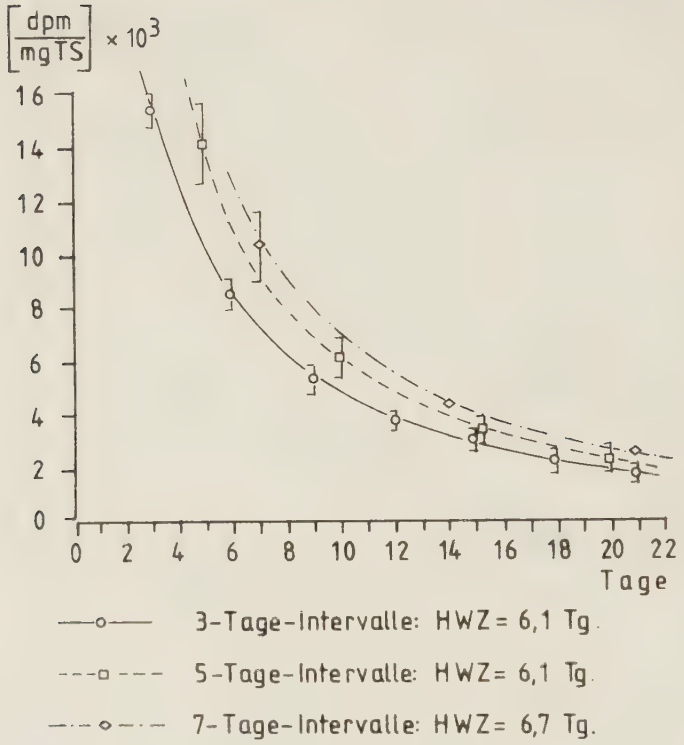

Abb. 12: Verlauf der Gesamtaktivität im Narbengewebe des 3., 5. und 7. Tages. (Abszisse: Tage nach der ersten Wundsetzung; Ordinate: Gesamtaktivität)

3-Tage-Intervalle

ln y = 1o,122 - o,114 x; r = -o,98; $s_{y.x}$ = o,147

Turnoverrate = 11,4% pro Tag; Halbwertszeit = 6,1 Tage

5-Tage-Intervalle

ln y = 1o,356 - o,114 x; r = -o,97; $s_{y.x}$ = o,181

Turnoverrate = 11,4% pro Tag; Halbwertszeit = 6,1 Tage

7-Tage-Intervalle

ln y = 1o,232 - o,1o4 x; r = -o,98; $s_{y.x}$ = o,181

Turnoverrate = 1o,4% pro Tag; Halbwertszeit = 6,7 Tage

	Gesamtaktivität [dpm/mg TS]	Spez.Akt. des Pro [dpm/µmol Pro]	Spez.Akt. des Hyp [dpm/µmol Hyp]
3. Tag	15744,4 ±611,8	5o294,4 ±9857,8	7236,4 ±94,4
6. Tag	8649,6 ±262,6	33o7o,1 ±7o88,1	6638,8 ±32,5
9. Tag	5315,2 ±72,o	1688o,5 ±3498,o	5973,7 ±197,3
12.Tag	391o,1 ±85,o	12761,2 ±1741,1	5595,6 ±834,2
15.Tag	3193,3 ±111,9	8984,6 ±125,7	5499,1 ±1o7,4
18.Tag	2332,1 ±117,8	6413,8 ±26,2	4592,7 ±41,5
21.Tag	1856,6 ±12,7	5o6o,5 ±192,2	3796,8 ±852,4
r_s	-o,99	-o,98	-o,94
El.-Gl.	$y=24892,o \cdot e^{-o,114x}$	$y=93o61,9 \cdot e^{-o,127x}$	$y=9o84,6 \cdot e^{-o,o34x}$
HWZ	6,1 Tage	5,5 Tage	2o,4 Tage

Tab. 5: Gesamtaktivität und spezifische Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin im Narbengewebe des 3. Tages; zusätzlich Angabe der Eliminationsgleichungen, der Halbwertszeiten sowie des SPEARMAN'schen Korrelationskoeffizienten

Für diese 3 Regressionsgeraden wurden die Steigungen (rsp. relative Turnoverraten) bezüglich signifikanter Unterschiede getestet. Für den zweiseitigen Test auf dem 5%-Niveau ließ sich die Nullhypothese nicht ablehnen. Die Turnoverraten können also als identisch angesehen werden.

Für den Turnover des Prolins wurden folgende Funktionen ermittelt:

3-Tage-Intervalle

$\ln y = 11,441 - o,127\ x$; $r = -o,97$; $s_{y.x} = o,2o3$

Turnoverrate = 12,7% pro Tag; Halbwertszeit = 5,5 Tage

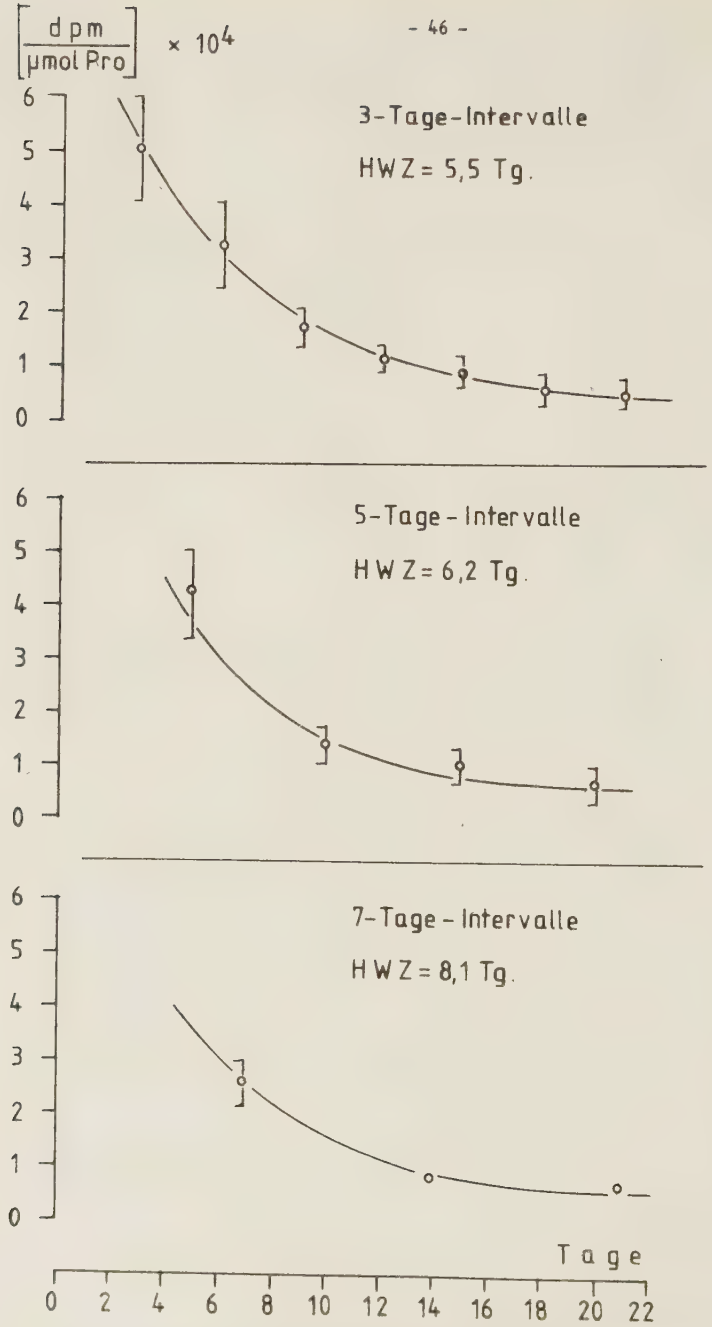

Abb. 13: Verlauf der spezifischen Aktivität des Prolins im Narbengewebe des 3., 5. und 7. Tages.

	Gesamtaktivität [dpm/mg TS]	Spez.Akt. des Pro [dpm/µmol Pro]	Spez.Akt. des Hyp [dpm/µmol Hyp]
5. Tag	14106,0 ±1557,8	43364,9 ±8947,3	7293,5 ±155,6
10.Tag	6063,3 ±418,8	13937,1 ±620,3	7008,9 ±107,3
15.Tag	4161,6 ±484,7	10178,2 ±743,2	5357,0 ±218,4
20.Tag	2414,1 ±388,3	7380,2 ±934,4	3563,3 ±259,5
r_s	-0,98	-0,98	-0,98
El.-Gl.	$y=31441,4 \cdot e^{-0,114x}$	$y=81824,3 \cdot e^{-0,112x}$	$y=11844,0 \cdot e^{-0,049x}$
HWZ	6,1 Tage	6,2 Tage	14,1 Tage

Tab. 6: Gesamtaktivität und spezifische Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin im Narbengewebe des 5. Tages; zusätzlich Angabe der Eliminationsgleichungen, der Halbwertszeiten sowie des SPEARMAN'schen Korrelationskoeffizienten.

5-Tage-Intervalle
$\ln y = 11,312 - 0,112\ x$; $r = -0,93$; $s_{y.x} = 0,291$
Turnoverrate = 11,2% pro Tag; Halbwertszeit = 6,2 Tage

7-Tage-Intervalle
$\ln y = 10,901 - 0,086\ x$; $r = -0,92$; $s_{y.x} = 0,303$
Turnoverrate = 8,6% pro Tag; Halbwertszeit = 8,1 Tage

Obwohl für diese Turnoverraten statistisch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte, so scheint in Abhängigkeit von der Länge des Intervalls eine Zunahme der Halbwertszeit vorzuliegen. Dies ist sicher auch dadurch bedingt, daß in den frühen Narben ein hoher Anteil geronnenen Blutes mitbestimmt wird, während in den Narben des 7. Tages diese Bestandteile schon weitgehend resorbiert sind (siehe hierzu auch die Aminosäurenanalysen des Narbengewebes Teil D 1). In der Abbildung 13 sind die zeitlichen Verläufe der spezifischen Aktivität des Prolins graphisch dargestellt.

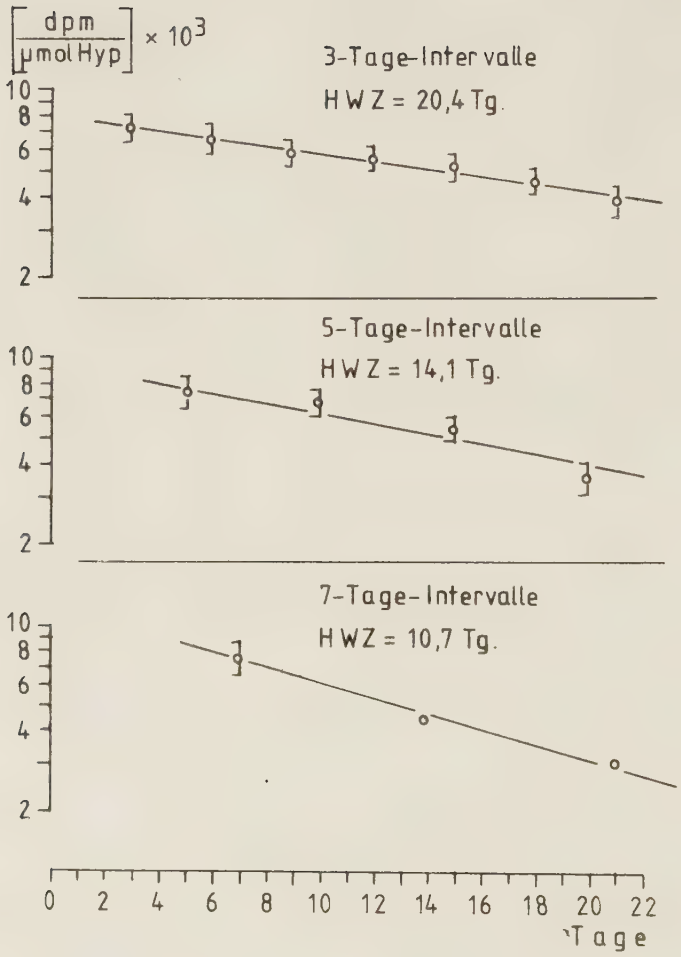

Abb. 14: Verlauf der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins im Narbengewebe des 3., 5. und 7. Tages; zur besseren Veranschaulichung der unterschiedlichen Steigungen wurde die spezifische Aktivität logarithmisch aufgetragen (Ordinate); auf der Abszisse: Tage nach der ersten Wundsetzung.

	Gesamtaktivität [dpm/mg TS]	Spez.Akt. des Pro [dpm/µmol Pro]	Spez.Akt. des Hyp [dpm/µmol Hyp]
7. Tag	1o294,6 ±1325,1	25243,o ±2o78,3	76oo,3 ±1o11,9
14.Tag	4o71,5 ---	89o4,6 ---	4486,2 ---
21.Tag	2475,3 ---	8286,5 ---	3o78,9 ---
r_s	-o,95	-o,95	-o,95
El.-Gl.	$y=27781,9\cdot e^{-o,1o4x}$	$y=54232,2\cdot e^{-o,o86x}$	$y=14219,4\cdot e^{-o,o65x}$
HWZ	6,7 Tage	8,1 Tage	1o,7 Tage

Tab. 7: Gesamtaktivität und spezifische Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin im Narbengewebe des 7. Tages; zusätzlich Angabe der Eliminationsgleichungen, der Halbwertszeiten sowie des SPEARMAN'schen Korrelationskoeffizienten.

Als wesentlichen Parameter für die Umsatzgeschwindigkeit des Kollagens im Narbengewebe wurden die Eliminationsgleichungen für die spezifische Aktivität des Hydroxyprolins errechnet:

3-Tage-Intervalle
$\ln y = 9,114 - o,o34\ x$; $r = -o,86$; $s_{y.x} = o,1o7$
Turnoverrate = 3,4% pro Tag; Halbwertszeit = 2o,4 Tage

5-Tage-Intervalle
$\ln y = 9,38o - o,o49\ x$; $r = -o,94$; $s_{y.x} = o,119$
Turnoverrate = 4,9% pro Tag; Halbwertszeit = 14,1 Tage

7-Tage-Intervalle
$\ln y = 9,562 - o,o65\ x$; $r = -o,97$; $s_{y.x} = o,141$
Turnoverrate = 6,5% pro Tag; Halbwertszeit = 1o,7 Tage

Für die Steigungen (rsp. Turnoverraten) der Narbengewebe des 3. und 5. Tages konnten signifikante Unterschiede auf dem 5%-Niveau nachgewiesen werden. Die Testung für das Narbengewebe des 5. und 7. Tages ergab bei p=o,o5 keine Signifikanz, vor allem bedingt durch die wenigen Punkte auf der Eliminationskurve bei den 7-Tagen-Intervallen.

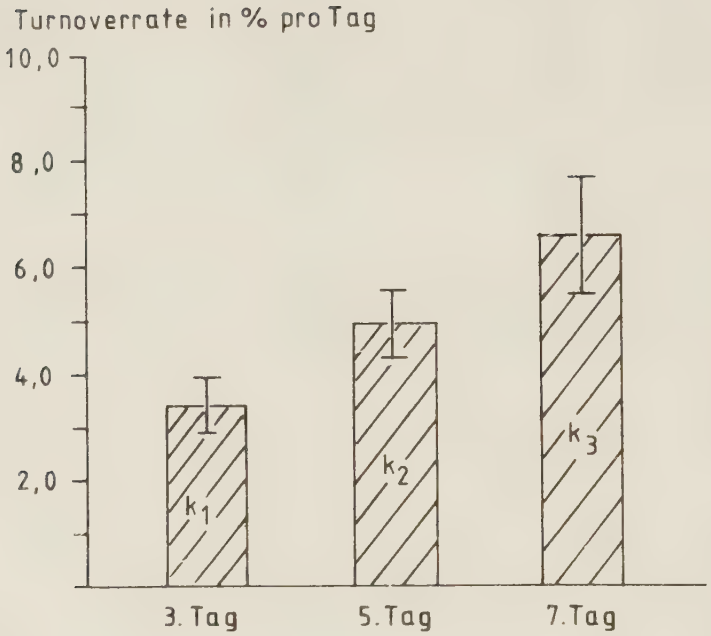

Abb. 15: Gegenüberstellung der Turnoverraten des Kollagens im Narbengewebe des 3., 5. und 7. Tages.
Für k_1 und k_2 konnten signifikante Unterschiede auf dem 5%-Niveau nachgewiesen werden.

Die Abbildung 14 zeigt die graphische Darstellung dieser Ergebnisse, die Abbildung 15 die Gegenüberstellung der Turnoverraten des Kollagens mit Angabe des Standardfehlers für den Regressionskoeffizienten.
In den frühen Stadien der Wundheilung ist also der Kollagenumsatz niedriger, erkennbar an einer größeren Halbwertszeit der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins bzw. einer kleineren Turnoverrate; in Abhängigkeit von der Zeit nach Wundsetzung nimmt die Halbwertszeit ab, der Kollagenumsatz wird beschleunigt.

Diese Befunde bestätigen ebenso wie die unter 4 a beschriebenen Ergebnisse die These, daß insbesondere in der frühen Phase der Wundheilung eine Verminderung des Abbaus wesentlich zur Kollagenkumulation beiträgt.

E. Diskussion

Das Problem der Untersuchung des Kollagenstoffwechsels im Granulationsgewebe ist von früheren Untersuchern an Hand verschiedener Modelle angegangen worden. Unter der Vorstellung, das Granulationsgewebe quantitativ ohne Kontamination durch das umgebende Gewebe zu isolieren, wird die Implantation von Schwämmen angewandt, in die hinein das Granulationsgewebe wachsen kann (z.B. Boucek u. Noble 1955; Edwards et al. 1957; Woessner u. Boucek 1961; Bole u. Robinson 1962; Hansen 1975). Jackson und Heininger (1974; 1975) implantierten subcutan Hohlzylinder aus rostfreiem Maschendraht, um so neu gebildetes Granulationsgewebe zu erhalten. Trotz des erheblichen Vorteils dieser Methode, die einfache und quantitative Gewinnung des Granulationsgewebes, ergeben sich mehrere Kritikpunkte: So stellten Bole und Robinson (1962) fest, daß die Zusammensetzung des Granulationsgewebes sowohl von der Größe des implantierten Schwammes als auch vom Ort der Implantation abhing. Auf eine etwas verschiedene Reaktion des Organismus wie bei der normalen Wundheilung weist das Vorhandensein von Riesenzellen in solchen Implantaten hin (Boucek u. Noble 1955). Der wesentlichste Einwand gegen die Anwendung dieser Methode bei der gegebenen Fragestellung der Arbeit war aber, daß die für die physiologische Wundheilung wesentliche mesenchymal-epitheliale Wechselwirkung hier nicht zum Tragen kommt. Diese Einwände gelten in zum Teil verstärkter Form für die Anwendung von Carrageenin zur Induktion von Granulationsgewebe (z.B. Pérez-Tamayo 197o).
Bei der Untersuchung des Kollagenmetabolismus geschädigter Organe, z.B. die Schädigung der Leber durch CCl_4 (Ruiz-Torres et al. 1976) oder der Myocardinfarkt (Judd u. Wexler 1975), ergibt sich immer die Schwierigkeit, daß das neu gebildete Kollagen

nicht isoliert untersucht werden kann, sondern nur im Organverband. Die gewonnenen Daten sind also immer eine Summation aus dem Stoffwechsel des noch gesunden Organbindegewebes und des Reparationsgewebes. Die gleiche Schwierigkeit ergibt sich bei der Untersuchung inzidierter und vernähter Hautwunden (Levenson et al. 1965; Madden und Peacock 1968; 1971). Die Narbe läßt sich nicht ohne angrenzende Haut präparieren.
Für die gegebene Fragestellung erwiesen sich daher offen granulierende Hautwunden als Versuchsmodell am vorteilhaftesten. Die Wundsetzung ließ sich mit der Modifikation der Methode von Stein und Keiser (1971) gut standardisieren; die Präparation des Granulationsgewebes erfolgte subtil entlang der Grenzlinie zur umgebenden Haut, so daß das Narbengewebe weitestgehend quantitativ untersucht werden konnte.

Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen über die Aminosäurenzusammensetzung des Narbengewebes zu den verschiedenen Zeiten gleichen in überwiegendem Maße denen früherer Untersucher (Dunphy u. Udupa 1955; Grillo et al. 1958). Als Hinweis auf die einsetzende Kollagensynthese ist bereits am 3. Tag nach Wundsetzung Hydroxyprolin im Granulationsgewebe nachweisbar. Die Konzentration steigt dann rasch an, um sich gegen Ende der 3. Woche dem Kontrollwert der Haut anzugleichen (Tab. 1 und Abb. 5). Die Aminosäurenzusammensetzung des Granulationsgewebes zeigt in den frühen Stadien noch ein sehr untypisches Bild für das Kollagen, gekennzeichnet insbesondere durch den hohen Anteil der Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Histidin sowie den niedrigen Hydroxylierungsgrad von Prolin und Lysin (Tab. 1 und 2). Dies deutet auf einen hohen Anteil nicht kollagenen Eiweißes im Narbengewebe hin. Der zeitliche Abfall dieser Aminosäuren weist auf die zunehmende Resorption nicht kollagenen Eiweißes und die synchron verlaufende Kollagendeposition hin (Abb. 6). Die kollagentypischen Aminosäuren zeigen daher eine gute positive Korrelation mit der Zeit, die kollagenuntypischen eine gute negative Korrelation (Tab. 1).
Das Gesamthydroxyprolin pro Narbe (rsp. Gesamtkollagen pro Narbe)erreicht einen Gipfelwert um den 5. Tag, um dann langsam abzufallen (Abb. 7). Dies steht in Übereinstimmung mit den Er-

gebnissen von Grillo et al. (1958) und Bothwell (1964) und ist Ausdruck der zu diesem Zeitpunkt einsetzenden Wundkontraktion. In diesem Zusammenhang sind die schon in der Einleitung erwähnten Untersuchungen von Abercombie et al. (1960) und James und Newcombe (1961) wesentlich, die einen raschen Abfall des Gesamtkollagens nach Entfernung einer die Wunde spreizenden Schiene nachweisen konnten. Diese Befunde deuten darauf hin, daß bei einsetzender Wundkontraktion, d.h., wenn sich die Wundränder nähern, ein verstärkter Kollagenabbau auftreten muß, wenn nicht die Syntheserate sinkt, wofür es in der aufgearbeiteten Literatur (siehe auch unter B 4.) keine Hinweise gibt.

Weitere Daten zu diesem Problem lieferten tracerkinetische Untersuchungen mit ^{3}H-markiertem Prolin. Die wesentliche Bedeutung dieser Methode für Untersuchungen des Kollagenstoffwechsels ist in Teil B 3. dargestellt worden. Zur Bestimmung der Turnoverraten des im Granulationsgewebe neu gebildeten Kollagens sollte während der Versuchsdauer ein steady state herrschen. Aus früheren Untersuchungen des Kollagenstoffwechsels ist bekannt, daß nach Verabreichung von markiertem Prolin innerhalb der ersten drei Tage eine rasche Verteilung, Verstoffwechselung und Elimination stattfindet. Die spezifische Aktivität des Hydroxyprolins steigt rasch an mit einem Gipfelwert am 2. Tag und fällt ebenso rasch wieder ab, um nach dem 3. Tag langsam abzuklingen. Die spezifische Aktivität des Prolins fällt zunächst sehr steil, danach (ab dem 3. Tag) langsamer ab (Emmrich et al. 1972). Dieser Verlauf ist bedingt durch Kollagenfraktionen unterschiedlicher Stoffwechselaktivität, die zum Teil durch ihre Löslichkeit definiert werden können (Jackson, D.S. u. Bentley 1960; Kao et al. 1961; Gerber et al. 1962; Nimni u. Bavetta 1964; Prockop 1964; Skalicky et al. 1976).
Um den Einfluß dieser frühen Phase auf die zu gewinnenden Daten auszuschließen, erfolgte die Wundsetzung erst 3 Tage nach Gabe des markierten Prolins. Zur Kontrolle der Untersuchungsbedingungen dienten Messungen der Gesamtaktivität im Serum und in der Haut sowie der spezifischen Aktivitäten von Prolin und Hydroxyprolin in der Haut (Tab. 3). Für alle Parameter kann bei gutem Korrelationskoeffizienten eine einfach logarithmische

Funktion angepaßt werden (Abb. 8 und 9). Die Untersuchungen spielen sich also auf dem ln-linearen Schenkel der Eliminationskurve ab. Die für das Kollagen der Haut ermittelte Halbwertszeit von 99 Tagen entsprechend einer Turnoverrate von o,7% (gemessen als Abfall der spezifischen Aktivität des Hydroxyprolins) stimmt relativ gut mit den Literaturangaben für die unlösliche bzw. stoffwechselpassive Kollagenfraktion überein (Lindstedt u. Prockop 1961; Gerber et al. 1962; Nimni u. Bavetta 1964; Emmrich et al. 1972).
Der steilere, aber auch ln-lineare Abfall der spezifischen Radiomarkierung des Prolins in der Haut mit einer Halbwertszeit von 17,4 Tagen ist Ausdruck der unmittelbaren Vorläuferfunktion des Prolins für das Hydroxyprolin bei der Kollagensynthese; die Funktion wird verfälscht durch den Stoffwechselumsatz nicht kollagenen Eiweißes, da das Hautkollagen nicht isoliert untersucht wurde. Gegen Ende der Versuchsdauer haben sich die Funktionen für Prolin und Hydroxyprolin einander genähert (Abb. 9); es ist ein Verhältnis der spezifischen Aktivitäten Prolin : Hydroxyprolin von 1,18 : 1 erreicht, was in etwa dem Verhältnis der Aminosäuren im Kollagen entspricht (Tab. 2; Eastoe 1955; Piez u. Gross 1959; Eastoe 1967).
Die Halbwertszeit der Gesamtaktivität im Serum entspricht mit einem Wert von 5,7 Tagen in etwa der Halbwertszeit der spezifischen Aktivität des Prolins im Narbengewebe und ist somit in erster Linie Ausdruck des Prolinmetabolismus.

Unter diesen Bedingungen der Prolinkinetik im Organismus der Ratte wurde der Kollagenstoffwechsel im Narbengewebe untersucht. Markiertes Prolin war also während der ganzen Versuchsdauer für die Inkorporation in das im Narbengewebe neu gebildete Kollagen verfügbar. Die Vergleichbarkeit des Angebots an markiertem Prolin in allen Versuchsanordnungen wurde durch die parallele Messung der spezifischen Aktivität des Prolins geprüft. Sowohl die Größenordnung als auch die Halbwertszeiten waren bei allen Gruppen vergleichbar (Tab. 4 - 7; Abb. 13); für die Turnoverraten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Messung der Gesamtaktivität im Narbengewebe ergab zwar ebenso keine signifikanten Unterschiede für die verschie-

denen Gruppen, ist aber nicht in gleicher Weise geeignet, das Angebot zu messen, da sie den Umsatz von Hydroxyprolin, Prolin und ihrer Metaboliten miterfaßt (Madden u. Peacock 1968).

Die angegebene Versuchsanordnung unterscheidet sich wesentlich von der anderer Untersucher. So verabreichten Madden und Peacock (1968), Hansen (1975) und Barnes et al. (1975) das markierte Prolin erst nach der Schadenssetzung zu festgelegten Zeitpunkten vor Tötung der Tiere. Die so erhaltenen Daten reflektieren also nur die während der Zeitspanne von der Injektion bis zur Tötung erfolgte Inkorporation in das Kollagen des Granulationsgewebes wieder; sie sind geeignet, Aussagen über die Syntheseraten des Kollagens im Wundgebiet zu machen. Beim Angebot des markierten Prolins von Beginn der Schadensreparation an spiegelt die im Hydroxyprolin gefundene Radioaktivität aber den Umsatz des Narbenkollagens wieder (siehe auch Ruiz-Torres et al. 1976).

Der Verlauf der spezifischen Aktivität im Narbengewebe des 3. bis 21. Tages wird wie bereits unter D 4a dargestellt durch die starke Kollagenkumulation verfälscht. Bei der graphischen Darstellung wird aber bereits deutlich, daß bis zum ca. 9. Tag die spezifische Aktivität nur sehr geringgradig abfällt (Abb. 1o). Dies kann durch einen verminderten Abbau bedingt sein. Deutlicher werden die Verhältnisse bei Gegenüberstellung der Radioaktivität im Hydroxyprolin pro Gewichtseinheit mit dem Verlauf der Kollagenkonzentration im Wundgebiet (Abb. 11): Bis etwa zum 7. Tag weichen die Kurven nur wenig voneinander ab, das im Granulationsgewebe deponierte Kollagen unterliegt nur einem geringen Umsatz; danach laufen die Kurven stärker auseinander, das Kollagen wird in zunehmendem Maße metabolisiert. Das verstärkte Auseinanderweichen der Kurven stimmt in etwa mit dem Zeitpunkt des Abfalls des Gesamtkollagens sowie der verstärkten Wundkontraktion überein.
Madden und Peacock (1971) stellten in ihren Untersuchungen 2 Gruppen von Tieren gegenüber: Eine Gruppe erhielt während des gesamten Wundheilungsprozesses täglich geringe Mengen ^{3}H-Prolin injiziert, bei diesen Tieren sollte die Kollagenkumulation er-

mittelt werden; eine zweite Gruppe erhielt 2o h vor Tötung eine einzelne Dosis ^{3}H-Prolin, die netto-Synthese-Raten sollten hiermit ermittelt werden. Wenn jetzt die aus den Syntheseraten errechnete Kollagenkumulation der gemessenen Kumulation gegenübergestellt wird, so gehen die Verläufe von der 3. Woche an stark auseinander. Die Autoren folgern hieraus einen verstärkten Umsatz erst ab der 3. Woche. Da diese Untersuchungen an vernähten Hautwunden erfolgten, ist eine Vergleichbarkeit mit den eigenen Ergebnissen nur beschränkt möglich.

Das Problem, Kollagenabbauraten zu verschiedenen Zeitpunkten der Wundheilung isoliert zu ermitteln, wurde an Hand einer besonderen Versuchsanordnung angegangen. Unter der Voraussetzung, daß für alle Tiere die gleichen kinetischen Bedingungen für das ^{3}H-Prolin existieren (s.o.), wurde in verschieden langen Intervallen (3, 5 und 7 Tage) Narbengewebe herauspräpariert und die Möglichkeit zum neuen Granulieren gegeben. Es wurden also kollagenkinetische Daten aus Narbengewebe immer des selben Stadiums ermittelt. Die Ergebnisse zeigen signifikante Unterschiede der Turnoverraten des Kollagens im Granulationsgewebe zu verschiedenen Zeiten (Abb. 14 und 15), wobei der geringste Abbau in den frühesten Stadien stattfindet und die Abbauraten im weiteren Verlauf kontinuierlich zunehmen. Diese Ergebnisse werden unterstrichen von den Befunden von Ruiz-Torres et al. (1976), die bei der Leberschädigung durch CCl_4 eine Herabsetzung des Kollagenabbaus in Abhängigkeit von der Frische des Schadens fanden.
Der Gedanke, daß die Epithelzellen des Wundrandes diesen Prozeß wesentlich beeinflussen erscheint nicht abwegig. Bei einsetzender Wundkontraktion, d.h. wenn die Wundränder sich nähern, setzt eine Zunahme der Kollagenabbaurate und ein Schwund des Gesamtkollagens im Wundgebiet ein. Bedeutsam in diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von Grillo und Gross (1967) über kollagenolytische Aktivität bei der Wundheilung. Das Vorhandensein von Kollagenasen sowohl epithelialer als auch mesenchymaler Herkunft und die Induzierbarkeit der mesenchymalen kollagenolytischen Aktivität durch Epithelzellen deutet auf einen solchen Regulationsprozeß hin.

Parallel zu diesen biochemischen Untersuchungen wurden elektronenmikroskopische Befunde über den Verlauf der Wundheilung erhoben. Schon sehr früh, vom 3. Tag an, sind im Granulationsgewebe fertig ausdifferenzierte Fibroblasten nachweisbar, was gut mit Literaturangaben übereinstimmt (z.B. Stearns 194o; Ross 1968a). Die größte Zahl der beobachteten Fibroblasten weist alle Zeichen einer hohen Syntheseleistung auf: Das endoplasmatische Retikulum füllt weite Teile des Zytoplasmas aus und ist dicht mit Ribosomen besetzt; hier findet die Aminosäurenaddition der kollagenen Vorstufen statt (Merker 1961; Ross u. Benditt 1962; Fernandez-Madrid 1967; 197o; Rohr 1965; Weinstein u. Leblond 1974). Zum Teil stellen sich die Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums sackförmig erweitert dar (Abb. V). Solche Bilder können einerseits durch die Schnittebene bedingt sein, andererseits auch Ausdruck der Syntheseaktivität sein. Mit Östrogen zur Synthese angeregte Fibroblasten des Rattenuterus zeigen z.B. solche Bilder (Ross 1968). Auf der anderen Seite ist ein dilatiertes endoplasmatisches Retikulum charakteristisch für den Vitamin C - Mangel; hier sind aber die Ribosomen zum Teil von den Membranen abgelöst bzw. unregelmäßig aufgereiht (Ross 1968). Die eigenen Befunde sprechen daher für eine hohe Syntheseleistung der beobachteten Fibroblasten. Der genaue Weg des Kollagenmoleküls innerhalb der Zelle bis zu seiner Sekretion nach außen läßt sich bei den vorliegenden Präparaten nicht nachverfolgen und ist nur mittels spezieller Techniken darstellbar (Untersuchungen hierüber siehe bei Ross u. Benditt 1962; 1965; Rohr 1965; Merker u. Struwe 1971; Weinstock u. Leblond 1974; Harwood et al. 1976). An der äußeren Zellmembran der Fibroblasten ist zum Teil ein wolkiges, fein filamentäres Material nachweisbar (Abb. VI und XII). Hier soll der Ort der späteren Fibrillenentstehung sein (Yardley et al. 196o; Merker 1961a; Fernando u. Movat 1963; Bublitz 1973).
Parallel zum Erscheinen der Fibroblasten im Wundgebiet werden im Extrazellulärraum kollagene Fibrillentypischer Querstreifung sichbar; sie liegen zum Teil ungeordnet und isoliert zwischen einem fein filamentärem, - granulärem Material oder sind schon gebündelt. Der Fibrillendurchmesser, der zwischen 3o und 4o nm schwankt und die Querstreifung mit einer Periodik von ca.

2o bis 3o nm sind typisch für neugebildete bzw. embryonale Fibrillen (Merker 1961). Die feinen Filamente mit einem Durchmesser von ca. 1o nm sind die Vorstufen der kollagenen Fibrillen, die durch weitere geordnete Aggregation und Bindung entstehen.

Alle typischen zellulären Elemente eines Granulationsgewebes können ebenso dargestellt werden: Monozyten, Histiozyten, Lymphozyten und Kapillarsprossen. Hierauf soll in dieser Untersuchung nicht näher eingegangen werden, ebenso nicht auf die bisher noch ungeklärte Herkunft der Fibroblasten im Wundgebiet (Literatur hierzu siehe unter B 4.).

Neben diesen typischen Befunden für ein proliferierendes, kollagensynthetisierendes Granulationsgewebe wurde intensiv nach Zeichen eines Kollagenabbaus gefahndet: Makrophagen, die Kollagenbruchstücke in intrazellulären Vakuolen aufwiesen oder eine Desintegration von Kollagenfibrillen im Extrazellulärraum konnten nicht gefunden werden. Dies ist insofern verständlich, als solche morphologischen Zeichen eines Kollagenabbaus bisher nur in Geweben mit sehr raschem Kollagenschwund nachgewiesen werden konnten (Usuku u. Gross 1965; Luse u. Hutton 1964; Schwarz u. Güldner 1967; Brandes u. Anton 1969; Parakkal 1969; 1972). Die von Pérez-Tamayo (197o) beschriebene Fibrillendesintegration in Carrageenin-Granulomen ist möglicherweise sogar auf das Carrageenin selbst mit seinem hohen Anteil an Ester-Sulfat zurückzuführen. Ein eventuell richtungsweisender Befund ist der Nachweis von membranbegrenzten Einschlüssen, die kollagene Fibrillen enthalten, in Fibroblastenfortsätzen im Granulationsgewebe des 5. und 9. Tages (Abb. IX u. XII). Ten Cate und Mitarbeiter (1974; 1975) beschrieben in ihren Arbeiten über Wundheilung ebensolche Bilder und schrieben den Fibroblasten auch eine Rolle bei der Remodellierung der Narbe zu; solche "phagozytierenden Fibroblasten" wurden von ihnen vorwiegend in den Randbereichen des Granulationsgewebes nachgewiesen. Der eigene Befund ist zu diskret, als daß hieraus wesentliche Aussagen abgeleitet werden könnten.

Vereinzelt können Fibroblasten dargestellt werden, die im Zytoplasma zahlreiche, isoliert verlaufende oder gebündelte Filamente enthalten (Abb. VI, IX und XIII). Fibroblasten eines sol-

chen Erscheinungsbildes werden als sogenannte Myofibroblasten für die Wundkontraktion verantwortlich gemacht (Gabbiani et al. 1972; 1976); das im Granulationsgewebe nachweisbare Kollagen vom embryonalen Typ, Typ III, soll von diesen Zellen synthetisiert werden (Bailey et al. 1975; Gabbiani et al. 1976).
Neben den beschriebenen elektronenmikroskopischen Befunden über Kollagensynthese und -abbau im Granulationsgewebe können Aussagen über zeitabhängige Veränderungen des Kollagenstoffwechsels im Wundgebiet aus den morphologischen Untersuchungen nicht abgeleitet werden.

Die Kollagenanreicherung im Granulationsgewebe in Abhängigkeit von der Zeit ist, wie die eigenen Untersuchungen zeigen, nicht allein Folge einer gesteigerten Synthese. Studien, die nur diesen Parameter erfassen (Madden u. Peacock 1968; Barnes et al. 1975; Hansen 1975), ebenso wie Messungen der Protokollagen-Prolin-Hydroxylase (Mussini et al. 1967; Stein u. Keiser 1971; Judd u. Wexler 1975) und in vitro Studien der Kollagensynthese (Diegelmann et al. 1975; Craig et al. 1975) beschreiben also die Kollagendynamik bei der Schadensreparation nur unvollständig. In Abhängigkeit von der Frische des Schadens findet nämlich zugleich eine Herabsetzung der Abbaurate statt. Dieser Umstand trägt entscheident dazu bei, daß das Kollagen in der Wunde kumuliert. Erst nach Füllung des Defektes in der Remodellierungsphase findet - wahrscheinlich induziert durch die epithelialen Zellen des Wundrandes - ein schnellerer Kollagenumsatz statt.

F. Zusammenfassung

Es werden die Umsatzraten des Kollagens im Granulationsgewebe offen granulierender Hautwunden der Ratte bestimmt. Hierfür werden verschiedene Versuchsanordnungen angewandt mit dem Ziel, zeitabhängige Veränderungen des Kollagenabbaus isoliert zu ermitteln. Gleichzeitig wird der Verlauf der Wundheilung

mit biochemischen und elektronenmikroskopischen Methoden studiert.
Bereits am 3. Tag der Wundheilung setzt die Kollagensynthese ein, erkennbar am biochemischen Nachweis von Hydroxyprolin und der elektronenmikroskopischen Darstellung von kollagenen Fibrillen und ausdifferenzierten Fibroblasten. Die Konzentration von Hydroxyprolin in der Wunde steigt bis zum 21. Tag in Form einer Sättigungskurve an. Das gleiche Verhalten zeigen andere kollagentypische Aminosäuren. Kollagenfremde Aminosäuren dagegen verhalten sich gegensinnig. Der Gesamtkollagengehalt des Narbengewebes erreicht ein Maximum am 5. Tag, um dann als Ausdruck eines beschleunigten Umsatzes bei der Wundkontraktion abzufallen.
Tracerkinetische Untersuchungen mit ^{3}H-Prolin zeigen einen herabgesetzten Umsatz des Narbenkollagens in den frühen Stadien; bei einsetzender Wundkontraktion, d.h., wenn die Wundränder sich nähern, wird der Umsatz beschleunigt. Als mögliches morphologisches Korrelat des angekurbelten Kollagenabbaus können phagozytierte Fibrillen in Fibroblasten dargestellt werden.
Es können signifikant unterschiedliche Halbwertszeiten des Kollagens im Narbengewebe des 3., 5. und 7. Tages ermittelt werden, wobei die längste Halbwertszeit im frühen, die kürzeste im späten Stadium festzustellen ist. Bei starker Kollagenproduktion findet also am Anfang eine Akkumulation bei verzögertem Abbau statt. Erst nach Füllung des Defektes in der späteren Remodellierungsphase kommt ein schnellerer Kollagenumsatz zustande.
Die Schlußfolgerung aus den hier gezeigten Resultaten ist, daß der Kollagenkatabolismus bei dem Prozeß der Narbenbildung eine regulierende Rolle spielt. Ferner ist die Vermutung nicht unberechtigt, daß der erwähnte Vorgang von den epithelialen Zellen der Umgebung gesteuert wird.

G. Bildanhang

Abb. I: Granulationsgewebe 3. Tag. Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme. Bereits fertig ausdifferenzierte Fibroblasten (F) mit reichlich rauhem endoplasmatischen Retikulum (ER). Im Bildzentrum ein Monozyt (M), bei (FV) eine Fibroblastenvorstufe mit nur wenig rauhem endoplasmatischen Retikulum. Im Extrazellulärraum quergeschnittene Einzelfibrillen (▼), kleine Fibrillenbündel (↓) und fein granuläres Material (X). Vergrößerung 1:21 000.

ABB. I

Abb. II: Granulationsgewebe 3. Tag. Histiozyt (H) mit Fortsatzbildungen an der Oberfläche und zahlreichen phagozytotischen Vakuolen. Bei (L) ein Lymphozyt. Am oberen Bildrand (X) könnte es sich um einen Lymphozyten oder Monozyten handeln. Im Extrazellulärraum unterschiedlich große Fibrillenbündel (↓) und fein granuläres Material (x); (F) gleich Fibroblastenfortsatz.
Vergrößerung 1:17 5oo

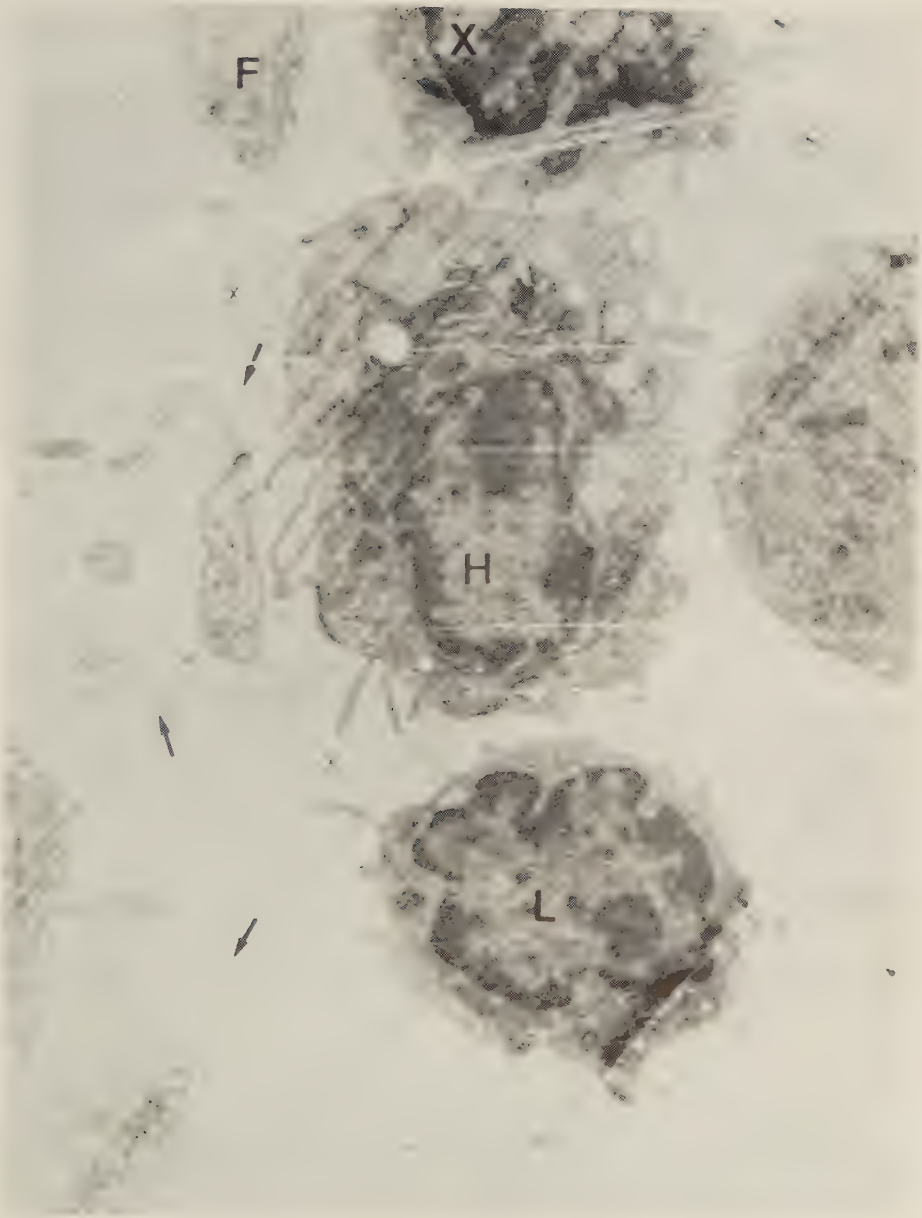

ABB. II

Abb. III: Granulationsgewebe 3. Tag. Großes Fibrillenbündel im Querschnitt mit fein filamentärem und fein granulärem Material in der Umgebung.
Vergrößerung 1:24 ooo

ABB. III

Abb. IV: Granulationsgewebe 3. Tag. Monozyt während der Differenzierung zum Histiozyten mit beginnender Granula- und Vakuolenbildung (▼) und unruhiger Oberfläche. Im Extrazellulärraum vereinzelt quergetroffene kollagene Fibrillen (↓) und fein filamentäres/fein granuläres Material (X).
Vergrößerung 1: 2o ooo

АВБ. IV

Abb. V: Granulationsgewebe 5. Tag. Typischer Fibroblast mit stark ausgeprägtem, teilweise erweiterten (X) rauhen endoplasmatischen Retikulum. (L) gleich Lipideinschlüsse. Im Extrazellulärraum zahlreiche kollagene Fibrillen. Vergrößerung 1:35 ooo

ABB. V

Abb. VI: Granulationsgewebe 5. Tag. Fibroblastenfortsätze mit rauhem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder Mikrotubuli (↓) bzw. Filamenten (▼). Im Extrazellulärraum (EZR) zahlreiche, quer- und schräg getroffene kollagene Fibrillen.
Vergrößerung 1:43 75o

ABB. VI

Abb. VII: Granulationsgewebe 5. Tag. Typischer Monozyt (M) mit anliegenden Zellfortsätzen. In der Umgebung Fibroblastenfortsätze (F) mit stark entwickeltem, rauhen endoplasmatischen Retikulum. Der Extrazellulärraum (EZR) ist gefüllt mit kollagenen Fibrillen in unterschiedlicher Verlaufsrichtung.
Vergrößerung 1:28 000

ΛΠΣ. VII

Abb. VIII: Granulationsgewebe 5. Tag. Ausschnitte aus drei Fibroblasten (F) mit stark entwickeltem, rauhen endoplasmatischen Retikulum; bei (G) Anschnitt eines Golgiapparates. Im Extrazellulärraum (EZR) zahlreiche kollagene Fibrillen.
Vergrößerung 1:17 5oo

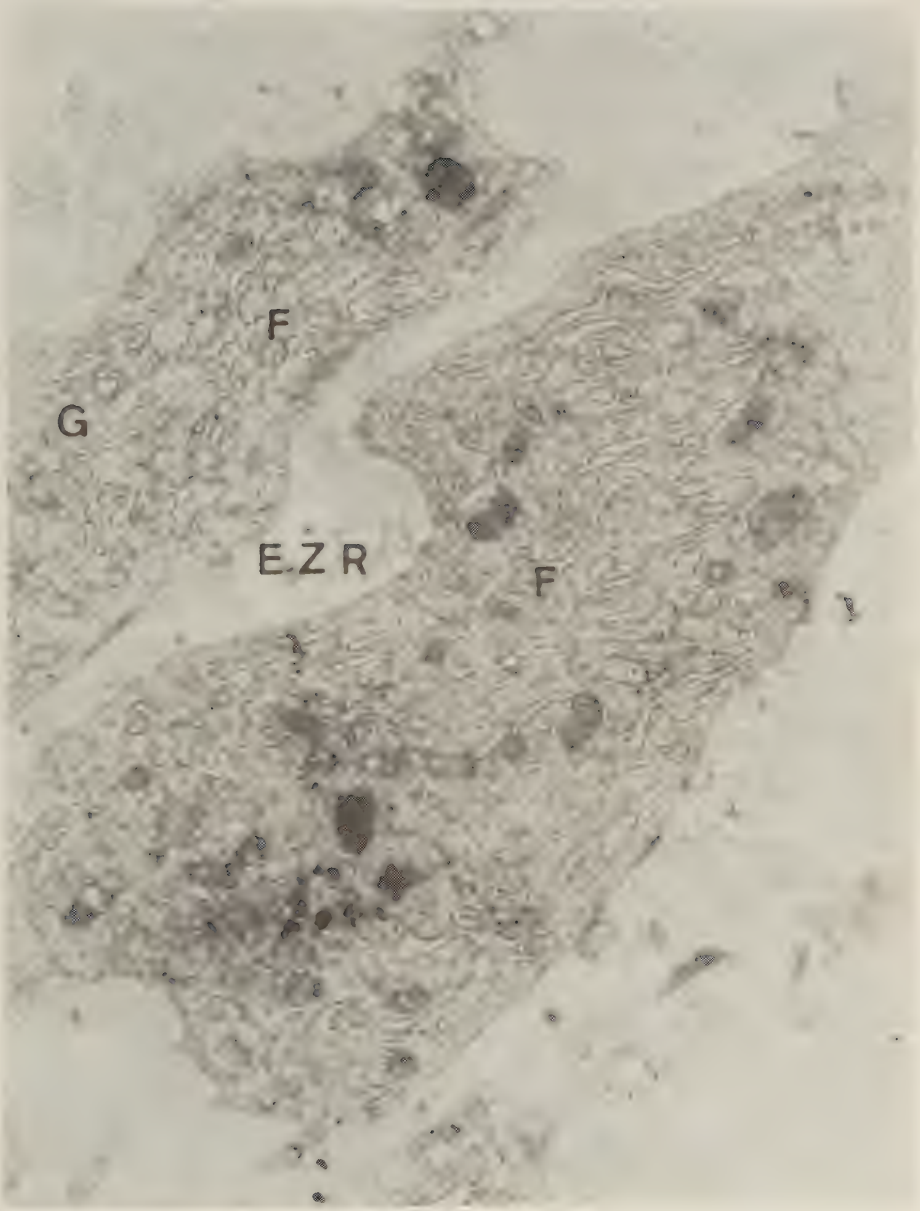

ABB. VIII

Abb. IX: Granulationsgewebe 5. Tag. Fibroblastenanschnitte (F) mit reichlich rauhem endoplasmatischen Retikulum, Golgi-Apparat (G) und Filamenten (↓); bei (↧) membranbegrenzter Einschluß, der kollagene Fibrillen enthält.
Vergrößerung 1:17 5oo

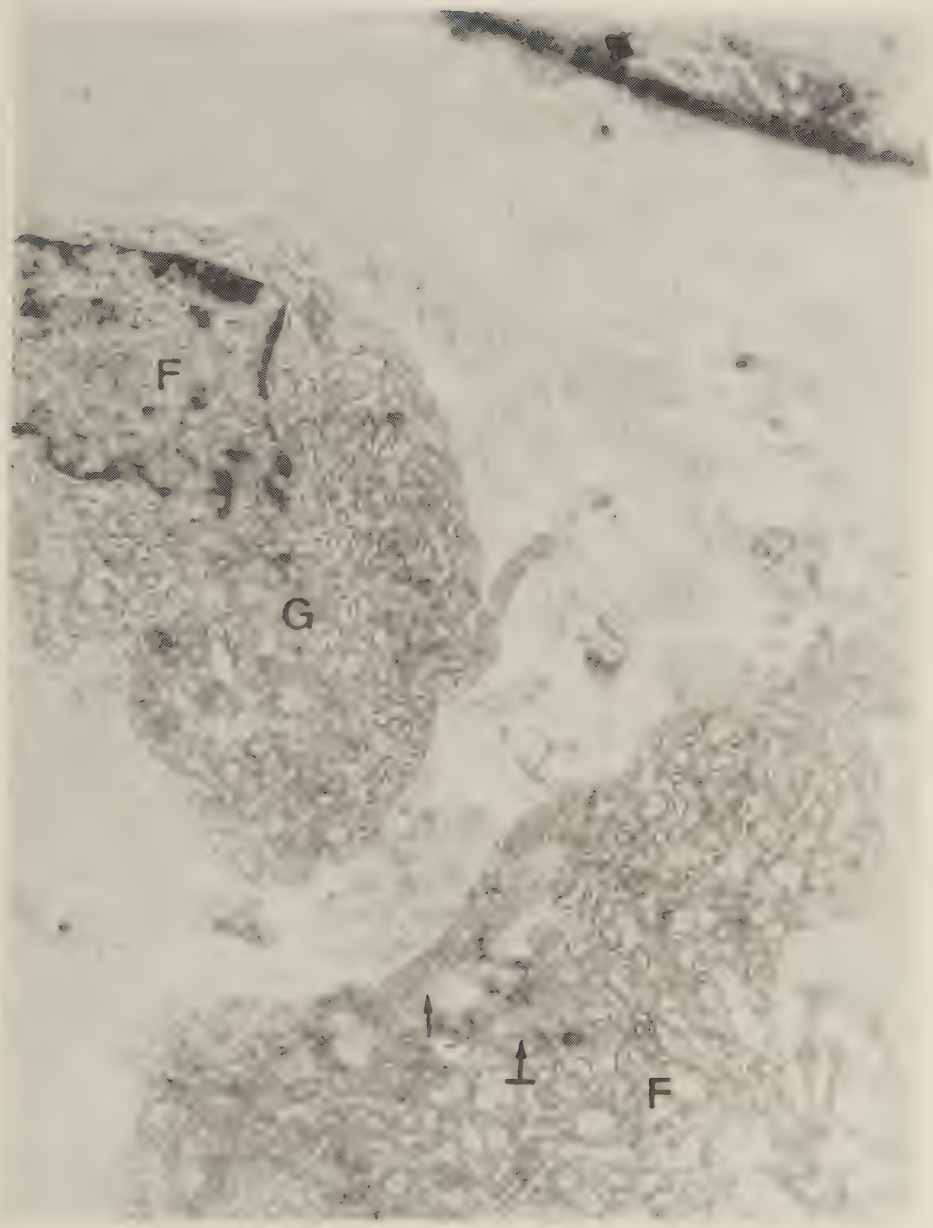

ABB. IX

Abb. X: Granulationsgewebe 7. Tag. Anschnitt eines Fibroblasten (F) mit rauhem endoplasmatischen Retikulum (ER) sowie Anschnitt eines Histiozyten (H) mit Einschlüssen (X). Im Extrazellulärraum quer- und schräg getroffene kollagene Fibrillen (↓).
Vergrößerung 1:35 ooo

ABB. X

Abb. XI: Granulationsgewebe 9. Tag. Extrzellulärraum mit regellos oder angedeutet parallel verlaufenden kollagenen Fibrillen (↓) und einem fein filamentärem, fein granulärem Material.
Vergrößerung 1:4o ooo

ABB. XI

Abb. XII: Granulationsgewebe 9. Tag. Fibroblastenfortsatz mit zahlreichen Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (ER) und membranbegrenzten Einschlüssen, die kollagene Fibrillen enthalten (↓). Im Extrazellulärraum zahlreiche, quer bis längs geschnittene kollagene Fibrillen.
Vergrößerung 1:43 750

ABB. XII

Abb. XIII: Granulationsgewebe 9. Tag. Teil eines Fibroblasten mit wenig Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen Retikulums (▼) aber zahlreichen, isoliert verlaufenden oder gebündelten Filamenten (↓). Vergrößerung 1:7o ooo

ABB. XIII

Abb. XIV: Granulationsgewebe 9. Tag. Übersichtsbild mit zahlreichen Anschnitten von Fibroblasten (F), Monozyten (M), Histiozyten (H) und Kapillarsprossen (K). Vergrößerung 1: 7 ooo

ABB. XIV

Abb. XV: Granulationsgewebe 17. Tag. Anschnitt eines Fibroblasten (F) mit stark entwickeltem, rauhen endoplasmatischen Retikulum. Bei (M) ein Monozyt. Im Extrazellulärraum Fibrillenbündel (↓) und granuläres Material.
Vergrößerung 1:17 5oo

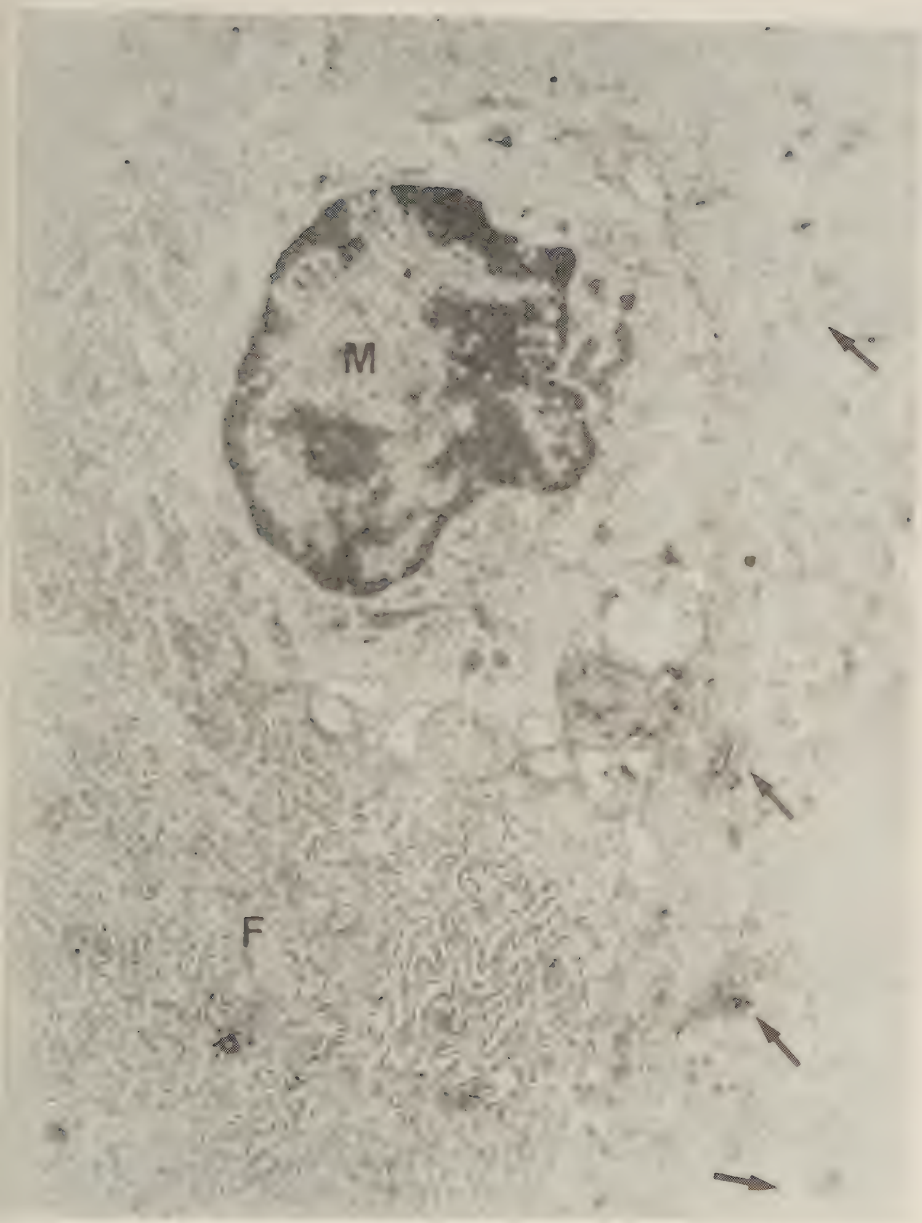

ABB. XV

Abb. XVI: Granulationsgewebe 21. Tag. Höhere Vergrößerung eines gewellt verlaufenden Fibrillenbündels mit typischer Querstreifung.
Vergrößerung 1:8o ooo

ABB. XVI

H. Literatur

Abercombie, M.; D.W. James; J.F. Newcombe: Wound Contraction in Rabbit Skin, Studied by Splinting the Wound Margins
J. Anat. 94: 17o-182 (196o)

Allgöwer, M.; L. Hulliger: Origin of Fibroblasts from Mononuclear Blood Cells: A Study on in vitro Formation of Collagen Precursor, Hydroxyproline, in Buffy Coat Cultures
Surgery 47: 6o3-61o (196o)

Bailey, A.J.; T.J. Sims; M. LeLous; S. Bazin: Collagen Polymorphism in Experimental Granulation Tissue
Biochem. Biophys. Res. Comm. 66: 116o-1165 (1975)

Barnes, M.J.; L.F. Morton; A.J. Bailey; R.C. Bennett: Studies on Collagen Synthesis in the Mature Dermal Scar in the Guinea Pig
Biochem. Soc. Trans. 3: 917-92o (1975)

Bauer, E.A.; A.Z. Eisen; J.J. Jeffrey: Regulation of Vertebrate Collagenase Activity in vivo and in vitro
J. Invest. Dermatol. 59: 5o-55 (1972)

Berg, R.A.; D.J. Prockop: The Thermal Transition of Nonhydroxylated Form of Collagen. Evidence for a Role for Hydroxyproline in Stabilizing the Triple Helix of Collagen
Biochem. Biophys. Res. Comm. 52: 115-12o (1973)

Bober, H.: Die Praxis der Ionenaustauscher-Chromatographie der Aminosäuren
GIT Fachz. Lab. 2o: 299-3o5; 537-545; 643-659 (1976)

Bole, G.G.; W.D. Robinson: Histochemical and Biochemical Variations in the Connective Tissue in Polyvinyl Alcohol Sponge Implants
J. Lab. Clin. Med. 59: 713-729 (1962)

Bornstein, P.; K.A. Piez: The Nature of the Intramolecular Cross-Links in Collagen. The Separation and Characterization of Peptides from the Cross-Link Region of Rat Skin Collagen
Biochemistry 5: 346o-3473 (1966)

Bothwell, J.W.: Collagen Resorption in Contracting Guinea Pig Wounds
Nature 201: 825 (1964)

Boucek, R.J.; N.L. Noble: Connective Tissue. A Technique for its Isolation and Study
Arch. Path. 59: 553-558 (1955)

Brandes, D.; E. Anton: An Electron Microscopic Cytochemical Study of Macrophages During Uterine Involution
J. Cell. Biol. 41: 450-461 (1969)

Bublitz, G.: Morphologische und Biochemische Untersuchungen über das Verhalten des Bindegewebes bei der strahlenbedingten Lungenfibrose
Normale und Pathologische Anatomie, Heft 26. G. Thieme, Stuttgart (1973)

Burleigh, M.C.; A.J. Barrett; G.S. Lazarus: Cathepsin B1. A Lysosomal Enzyme That Degrades Native Collagen
Biochem. J. 137: 387-398 (1974)

Craig, R.D.P.; J.D. Schofield; D.S. Jackson: Collagen Biosynthesis in Normal and Hypertrophic Scars and Keloid as a Function of the Duration of the Scar
Br. J. Surg. 62: 741-744 (1975)

Diegelmann, R.F.; L.C. Rothkopf; J.K. Cohen: Measurement of Collagen Biosynthesis During Wound Healing
J. Surg. Res. 19: 239-243 (1975)

Donoff, R.B.; J.E. McLennan; H.C. Grillo: Preparation and Properties of Collagenases from Epithelium and Mesenchym of Healing Mammalian Wounds
Biochim. Biophys. Acta 227: 639-653 (1971)

Dunphy, J.E.; K.N. Udupa: Chemical and Histochemical Sequences in the Normal Healing Wounds
New Engl. J. Med. 253: 847-851 (1955)

Eastoe, J.E.: The Amino Acid Composition of Mammalian Collagen and Gelatin
Biochem. J. 61: 589-600 (1955)

Eastoe, J.E.: Composition of Collagen and Allied Proteins
In: G.N. Ramachandran "Treatise on Collagen" Academic Press, London-New York. Vol. 1: 1-72 (1967)

Edwards, L.C.; L.N. Pernokas; J.E. Dunphy: The Use of a Plastic Sponge to Sample Regenerating Tissue in Healing Wounds
Surg. Gynec. Obstet. 105: 303-309 (1957)

Eisen, A.Z.; J.J. Jeffrey; J. Gross: Human Skin Collagenase. Isolation and Mechanism of Attack on the Collagen Molecule
Biochim. Biophys. Acta 151: 637-645 (1968)

Eisen, A.Z.; E.A. Bauer; J.J. Jeffrey: Human Skin Collagenase. The Role of Serum Alpha-Globulins in the Control of Activity in vitro and in vivo
Proc. Nat. Acad. Sci. 68: 248-251 (1971)

Emmrich, R.; H. Koch; M. Rödenbeck; H. Marek; A. Ziegler: Mathematische Modellierung des Kollagenstoffwechsels. Tracerkinetische Untersuchungen mit ^{3}H-Prolin am Organbindegewebe gesunder Ratten
Zschr. Inn. Med. 27: 685-693 (1972)

Fernandez-Madrid, F.: Biosynthesis of Collagen. Biochemical and Physicochemical Characterization of Collagen-Synthesizing Polyribosomes
J. Cell. Biol. 33: 27-42 (1967)

Fernandez-Madrid, F.: Collagen Biosynthesis
Clin. Orth. Rel. Res. 68: 163-181 (1970)

Fernando, N.V.P.; H.Z. Movat: Fibrillogenesis in Regenerating Tendon
Lab. Invest. 12: 214-229 (1963)

Gabbiani, G.; B.J. Hirschel; G.B. Ryan; P.R. Statkov; G. Majno: Granulation Tissue as a Contractile Organ
J. Exptl. Med. 135: 719-734 (1972)

Gabbiani, G.; M. LeLous; A.J. Bailey; S. Bazin; A. Delaunay: Collagen and Myofibroblasts of Granulation Tissue
Virchows Arch. B Cell Path. 21: 133-145 (1976)

Gallop, P.M.: O.O. Blumenfeld; S. Seifter: Structure and Metabolism of Connective Tissue Proteins
Ann. Rev. Biochem. 41: 617-672 (1972)

Gerber, G.; G. Gerber; K.J. Altmann: Studies on the Metabolism of Tissue Proteins. I. Turnover of Collagen Labeled with Proline-U-C^{14} in Young Rats
J. Biol. Chem. 235: 2653-2656 (1960)

Gerber, G.; G. Gerber; K.J. Altmann: Studies of Collagen Turnover in Lathyric Rats
Arch. Biochem. Biophys. 96: 601-604 (1962)

Gibson, W.T.; D.W. Milsom; F.S. Steven; J.S. Lowe: Collagenolytic Cathepsin Activity in Rabbit Peritoneal Polymorphonuclear Leucocytes
Biochem. Soc. Trans. 4: 627-629 (1976)

Gillman, T.: On Some Aspects of Collagen Formation in Localized Repair and in Diffuse Fibrotic Reactions to Injury
In: B.S. Gould "Treatise on Collagen" Academic Press, London-New York. Vol. 2, Part B: 331-407 (1968)

Gould, B.S.: Collagen Biosynthesis
In: B.S. Gould "Treatise on Collagen" Academic Press, London-New York. Vol. 2, Part A: 139-188 (1968)

Graham, R.C.; M.J. Karnovsky: The Early Stages of Absorption of Injected Horseradish-Peroxydase in the Proximal Tubules of Mouse Kidney: Ultrastructural Cytochemistry by a New Technique
J. Histochem. Cytochem. 14: 291-302 (1966)

Grillo, H.C.; G.T. Watts; J. Gross: Studies in Wound Healing. I. Contraction and Wound Contents
Ann. Surg. 148: 145-152 (1958)

Grillo, H.C.: Origin of Fibroblasts in Healing Wounds: An Autoradiographic Study of Inhibition of Cellular Proliferation by Local X-Irradiation
Ann. Surg. 157: 453-467 (1963)

Grillo, H.C.; J. Gross: Collagenolytic Activity During Mammalian Wound Repair
Dev. Biol. 15: 3oo-317 (1967)

Gross, J.; C.M. Lapiere: Collagenolytic Activity in Amphibian Tissues: A Tissue Culture Assay
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 1o14-1o22 (1962)

Gross, J.; Y. Nagai: Specific Degradation of the Collagen Molecule by Tadpole Collagenolytic Enzyme
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54: 1197-12o4 (1965)

Halme, J.; K.J. Kivirikko; K. Simons: Isolation and Partial Characterization of Highly Purified Protocollagen Proline Hydroxylase
Biochim. Biophys. Acta 198: 46o-47o (197o)

Hansen, T.M.: Collagen Development in Granulation Tissue as Compared with Collagen of Skin and Aorta from Injured and Not-Injured Rats
Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A 83: 721-732 (1975)

Harkness, R.D.: Biological Functions of Collagen
Biol. Rev. 36: 399-463 (1961)

Harper, E.; J. Gross: Separation of Collagenase and Peptidase Activities of Tadpole Tissue Culture
Biochim. Biophys. Acta 198: 286-292 (197o)

Harper, E.; J. Gross: Collagenase, Procollagenase and Activator Relationships in Tadpole Tissue Cultures
Biochem. Biophys. Res. Comm. 48: 1147-1152 (1972)

Harris, E.D.; S.M. Krane: An Endopeptidase from Rheumatoid Synovial Tissue Culture
Biochim. Biophys. Acta 258: 566-576 (1972)

Harris, E.D.; S.M. Krane: Collagenases
New Engl. J. Med. 291: 557-563; 6o5-6o9; 652-66o (1974)

Harwood, R.; M.E. Grant; D.S. Jackson: The Route of Secretion of Procollagen. The Influence of $\alpha\alpha'$-Bipyridyl, Colchicine, and Antimycin A on the Secretory Process in Embryonic Chick Tendon and Cartilage Cells
Biochem. J. 156: 81-9o (1976)

von Hippel, P.H.: Structure and Stabilization of the Collagen Molecule in Solution
In: G.N. Ramachandran "Treatise on Collagen" Academic Press, London-New York. Vol. 1: 253-338 (1967)

Hodge, A.J.: Structure at the Electron Microscopic Level
In: G.N. Ramachandran "Treatise on Collagen" Academic Press, London-New York. Vol. 1: 185-2o6 (1967)

Jackson, D.S.: Some Biochemical Aspects of Fibrogenesis and Wound Healing
New Engl. J. Med. 259: 814-82o (1958)

Jackson, D.S.; J.P. Bentley: On the Significance of Extractable Collagens
J. Biophys. Biochem. Cytolog. 7: 37-42 (196o)

Jackson, D.S.; J.P. Bentley: Collagen - Glycosaminoglycan Interactions
In: B.S. Gould "Treatise on Collagen" Academic Press, London-New York. Vol. 2, Part A: 189-214 (1968)

Jackson, S.H.; J.A. Heininger: A Study of Collagen Reutilization Using an $^{18}O_2$-Labeling Technique
Clin. Chim. Acta 51: 163-171 (1974)

Jackson, S.H.; J.A. Heininger: Proline Recycling During Collagen Metabolism as Determined by Concurrent $^{18}O_2$- and ^{3}H-Labeling
Biochim. Biophys. Acta 381: 359-367 (1975)

James, D.W.; J.F. Newcombe: Granulation Tissue Resorption During Free and Limited Contraction of Skin Wounds
J. Anat. 95: 247-255 (1961)

Judd, J.T.; B.C. Wexler: Prolyl Hydroxylase and Collagen Metabolism after Experimental Myocardial Infarction
Amer. J. Physiol. 228: 212-216 (1975)

Kao, K.Y.T.; D.M. Hilker; T.H. McGavack: Connective Tissue IV: Synthesis and Turnover of Proteins in Tissues of Rats
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1o6: 121-124 (1961)

Koblet, H.: Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie
G. Thieme, Stuttgart (1971)

Koch, H.; R. Emmrich; H. Marek: Tierexperimentelle Untersuchungen über die Kinetik von Tritium-markiertem Prolin
Zschr. Inn. Med. 26: 166-17o (1971)

Koch, I.; A. Ruiz-Torres: Untersuchungen über den Umsatz von Kollagen bei der experimentellen Osteoporose als Modell der Altersosteoporose
Z. Gerontologie 9: 387-39o (1976)

Kühn, K.: Kollagenstoffwechsel
Arzneim. Forsch. 24: 225-228 (1974)

Lazarus, G.S.; R.S. Brown; J.R. Daniels; H.M. Fullmer: Human Granulocyt Collagenase
Science 159: 1483-1485 (1968)

Levenson, S.M.; E.F. Geever; L.V. Crowley; J.F. Oates; C.W. Berard; H. Rosen: The Healing of Rat Skin Wounds
Ann. Surg. 161: 293-3o8 (1965)

Lindner, J.: Über die Synthese der organischen Interzellularsubstanz in Knorpel und Knochen
Verh. deutsch. Ges. Path. 47: 15o-157 (1963)

Lindstedt, S.; D.J. Prockop: Isotopic Studies on Urinary Hydroxyproline as Evidence for Rapidly Catabolized Forms of Collagen in Young Rats
J.Biol. Chem. 236: 1399-14o3 (1961)

Luse, S.; R. Hutton: An Electron Microscopic Study of the Fate of Collagen in the post partum Uterus
Anat. Rec. 148: 3o8 (1964)

MacDonald, R.A.: Origin of Fibroblasts in Experimental Healing Wounds: Autoradiographic Studies Using Tritiated Thymidine
Surgery 46: 376-382 (1959)

Madden, J.W.; E.E. Peacock: Studies on the Biology of Collagen During Wound Healing: I. Rate of Collagen Synthesis and Deposition in Cutaneous Wounds of the Rat
Surgery: 64: 288-294 (1968)

Madden, J.W.; E.E. Peacock: Studies on the Biology of Collagen During Wound Healing: III. Dynamic Metabolism of Scar Collagen and Remodelling of Dermal Wounds
Ann. Surg. 174: 511-52o (1971)

Mancini, R.E.; O. Villar; E. Stein; H. Fiorini; A Histochemical and Radiographic Study of the Participation of Fibroblasts in the Production of Mucopolysaccharides in Connective Tissue
J. Histochem. Cytochem. 9: 278-291 (1961)

Martin, Ch.J.; A.E. Axelrod: A Modified Method for the Determination of Hydroxyproline
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83: 461-462 (1953)

Mathews, M.B.: The Interaction of Proteoglycans and Collagen - Model Systems
In: E.A. Balazs "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix" Academic Press, London-New York. Vol. 2: 1155-1169 (197o)

Merker, H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über Fibrillogenese im menschlichen Granulationsgewebe
Langenbecks Arch. klin. Chir. 297: 411-423 (1961)

Merker, H.J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen
Z. Zellforsch. 53: 411-43o (1961a)

Merker, H.J.; K. Struwe: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Sekretion der bindegewebigen Interzellularsubstanz
Z. Zellforsch. 115: 212-225 (1971)

Merker, H.J.; Th. Günther: Die elektronenmikroskopische Darstellung von Glycosaminoglycanen im Gewebe mit Rutheniumrot
Histochemie 34: 293-3o3 (1973)

Merker, H.J.: Entstehung und Reifung des Bindegewebes und die pharmakologische Beeinflussung dieser Vorgänge
In: "Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthritis" Byk Gulden Pharmazeutika, Medizinisch - Wissenschaftliche Abt., Konstanz (1974)

Miller, E.J.; E.D. Harris; E. Chung; J.E. Finch; P.A. McCroskery; W.T. Butler: Cleavage of Typ II and Typ III Collagens with Mammalian Collagenase: Site of Cleavage and Primary Structure at the NH_2-Terminal Portion of the Smaller Fragment Released from Both Collagens
Biochemistry 15: 787-792 (1976)

Moore, S.; W.H. Stein: Chromatography of Amino Acids on Sulfonated Polystyrene Resins
J. Biol. Chem. 192: 663-681 (1951)

Moore, S.; W.H. Stein: Procedures for the Chromatographic Determination of Amino Acids on Four Percent Cross-Linked Sulfonated Polystyrene Resins
J. Biol. Chem. 211: 893-9o6 (1954)

Mussini, E.; J.J. Hutton; S. Udenfriend: Collagen Proline Hydroxlase in Wound Healing, Granuloma Formation, Scurvy, and Growt
Science 157: 927-928 (1967)

Neuberger, A.; J.C. Perrone; H.G.B. Slack: The Relative Metabolich Inertia of Tendon Collagen in the Rat
Biochem. J. 49: 199-2o4 (1951)

Neuberger, A.; H.G.B. Slack: The Metabolism of Collagen from Liver, Bone, Skin, and Tendon in the Normal Rat
Biochem. J. 53: 47-52 (1953)

Neumann, R.E.; M.A. Logan: The Determination of Hydroxyproline
J. Biol. Chem. 184: 299-3o6 (195o)

Newcombe, J.F.: Wound Healing
In: W.T. Irvine "Scientific Basis of Surgery" Churchill Livingstone, Edinburgh-London: 433-456 (1972)

Nie, N.H.; C.H. Hull; J.G. Jenkins; K. Steinbrenner; D.H. Bent: SPSS. Statistical Package for Social Sciences
McGraw-Hill Book Company, New York (1975)

Nimni, M.E.; L.A. Bavetta: Collagen Synthesis and Turnover in the Growing Rat Under the Influence of Methyl Prednisolone
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117: 618-623 (1964)

Nordwig, A.: Collagenolytic Enzymes
Adv. Enzym. 34: 155-2o5 (1971)

Oronsky, A.L.; R.J. Perper; H.C. Schroder: Phagocytic Release and Activation of Human Leukocyt Procollagenase
Nature 246: 417-419 (1973)

Parakkal, P.F.: Role of Macrophages in Collagen Resorption During Hair Growth Cycle
J. Ultrastruct. Res. 29: 21o-217 (1969)

Parakkal, P.F.: Macrophages: The Time Course and Sequence of their Distribution in the post partum Uterus
J. Ultrastruct. Res. 4o: 284-291 (1972)

Pataki, G.: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäuren- und Peptid-Chemie
Walter de Gruyter u. Co., Berlin (1966)

Peacock, E.E.; W. van Winkle: Surgery and Biology of Wound Repair
W.B. Saunders Comp., Philadelphia-London-Toronto (197o)

Pérez-Tamayo, R.: Collagen Resorption in Carrageenin Granulomas.
I. Collagenolytic Activity in invitro Explants
Lab. Invest. 22: 137-141 (197o)
II. Ultrastructure of Collagen Resorption
Lab. Invest. 22: 142-159 (197o)

Piez, K.A.; J. Gross: The Amino Acid Composition and Morphology of Some Invertebrate and Vertebrate Collagens
Biochim. Biophys. Acta 34: 24-39 (1959)

Prockop, D.J.: Isotopic Studies on Collagen Degradation and Urine Excretion of Hydroxyproline
J. Clin. Invest. 43: 453-46o (1964)

Prockop, D.J.; K.J. Kivirikko: Hydroxyproline and the Metabolism of Collagen
In: B.S. Gould "Treatise on Collagen" Academic Press, London-New York. Vol. 2, Part A: 215-246 (1968)

Prockop, D.J.: Intracellular Biosynthesis of Collagen and Interactions of Protocollagen Proline Hydroxylase with Large Polypeptides
In: E.A. Balazs "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix" Academic Press, London-New York. Vol. 1: 335-37o (197o)

Reid, K.B.M.; D.M. Lowe; R.R. Porter: Isolation and Characterization of C1q, a Subcomponent of the First Component of Complement from Human and Rabbit Sera
Biochem. J. 13o: 749-763 (1972)

Reid, K.B.M.: A Collagen-Like Amino Acid Sequence in a Polypeptide Chain of Human C1q (a Subcomponent of the First Component of Complement)
Biochem. J. 141: 189-2o3 (1974)

Robertson, P.B.; R.B. Ryel; R.E. Taylor; K.W. Shyu; H.M. Fullmer: Collagenase: Localization in Polymorphonuclear Leukocyt Granules in the Rabbit
Science: 177: 64-65 (1972)

Robins, S.P.; M. Shimokomaki; A.J. Bailey: The Chemistry of the Collagen Cross Links. Age Related Changes in the Reducible Components of Intact Bovine Collagen Fibres
Biochem. J. 131: 771-78o (1973)

Rödenbeck, M.; A, Ziegler; H. Marek; Th. Friedrich: Computer Analysis of a Tracer-Kinetic Model of the Collagenic Metabolism of the Rat's Aorta
J. Theor. Biol. 49: 191-2oo (1975)

Rohr, H.: Die Kollagensynthese in ihrer Beziehung zur submikroskopischen Struktur des Osteoblasten (elektronenmikroskopisch - autoradiographische Untersuchung mit Tritium-markiertem Prolin)
Virchows Arch. Path. Anat. 338: 342-354 (1965)

Ross, R.; E.P. Benditt: Wound Healing and Collagen Formation. III. A Quantitative Radiographic Study of the Utilization of Proline-H^3 in Wounds from Normal and Scorbutic Guinea Pigs
J. Cell Biol. 15: 99-1o8 (1962)

Ross, R.; E.P. Benditt: Wound Healing and Collagen Formation. V. Quantitative Electron Microscopic Radioautographic Observations of Proline-H^3 Utilization by Fibroblasts
J. Cell Biol. 27: 83-1o6 (1965)

Ross, R.: The Fibroblast and Wound Repair
Biol. Rev. 43: 51-96 (1968a)

Ross, R.: The Connective Tissue Fiber Forming Cell
In: B.S. Gould "Treatise on Collagen" Academic Press, London-New York. Vol. 2, Part A: 1-82 (1968)

Ross, R.; N.B. Everett; R. Tyler: Wound Healing and Collagen Formation. VI. The Origin of Wound Fibroblasts Studied in Parabiosis
J. Cell Biol. 44: 645-654 (197o)

Ruiz-Torres, A.; I. Kürten: Altersabhängige Veränderungen des Aminosäurenstoffwechsels der Ratte unter besonderer Berücksichtigung des Prolin
Z. Gerontologie 7: 133-144 (1974)

Ruiz-Torres, A.; I. Kürten: Is there a Recycling of Hydroxyproline?
Experientia 32: 555-556 (1976)

Ruiz-Torres, A.; I. Kürten; M. Rosenstock: The Dynamics of Collagen Deposition in the Liver Damaged by CCl_4
Beitr. Path. Bd. 158: 287-295 (1976)

Sandison, J.C.: Observations on the Growth of Blood Vessels as Seen in the Transparent Chamber Introduced into the Rabbit's Ear
Amer. J. Anat. 41: 475-496 (1928)

Schiffmann, E.; G.R. Martin: Spontaneous Generation of Cross-Links in Aldehyd Containing Collagen
Arch. Biochem. Biophys. 138: 226-232 (197o)

Schwarz, W.; F.-H. Güldner: Elektronenmikroskopische Untersuchungen des Kollagenabbaus im Uterus der Ratte nach Schwangerschaft
Z. Zellforsch. 83: 416-426 (1967)

Seifter, S.; E. Harper: Collagenases
Meth. Enzym. 14: 613-635 (197o)

Shoshan, S.; J. Gross: Biosynthesis and Metabolism of Collagen and its Role in Tissue Repair Processes
Israel J. Med. Sci. 1o: 537-561 (1974)

Skalicky, M.; H. Niedermüller; G. Hofecker: Ein mathematisches Modell der Stoffwechselkinetik des Sehnen- und Hautkollagens junger und alter Ratten
1. Wiener Symposion für Experimentelle Gerontologie, Wien, Mai 1976

Spaet, T.H.; J. Cinton; M. Spivack: Some Properties of the Platelet - Connective Tissue Mixed Agglutination Reaction
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 111: 292-295 (1962)

Speakman, P.T.; Proposed Mechanism for the Biological Assembly of Collagen Triple Helix
Nature 229: 241-243 (1971)

Stearns, M.L.: Studies on the Development of Connective Tissue in Transparent Chambers in the Rabbit's Ear
Amer. J. Anat. 66: 133-176 (1940)

Stein, H.D.; H.R. Keiser: Collagen Metabolism in Granulating Wounds
J. Surg. Res. 11: 277-283 (1971)

Taylor, H.E.; A.M. Saunders: The Association of Metachromatic Ground Substance with Fibroblastic Activity in Granulation Tissue
Amer. J. Path. 33: 525-537 (1957)

TenCate, A.R.; E. Freeman: Collagen Remodelling by Fibroblasts in Wound Repair. Preliminary Observations
Anat. Rec. 179: 543-546 (1974)

TenCate, A.R.; D.A. Deporter: The Degradative Role of the Fibroblast in the Remodelling and Turnover of Collagen in Soft Connective Tissue
Anat. Rec. 182: 1-14 (1975)

Thompson, R.C.; J.E. Ballou: Studies of the Metabolic Turnover with Tritium as a Tracer. V. The Predominantly Non-Dynamic State of Body Constituents in the Rat
J. Biol. Chem. 223: 795-809 (1956)

Tkocz, C.; K. Kühn: The Formation of Triple-Helical Collagen Molecules from $alpha_1$ or $alpha_2$ Polypeptid Chains
Europ. J. Biochem. 7: 454-462 (1969)

Tokoro, Y.; A.Z. Eisen; J.J. Jeffrey: Characterization of Collagenase from Rat Skin
Biochim. Biophys. Acta 258: 289-3o2 (1972)

Traub, W.; K.A. Piez: The Chemistry and Structure of Collagen
Adv. Protein Chem. 25: 243-352 (1971)

Usuku, G.; J. Gross: Morphological Studies of Connective Tissue Resorption in the Tail Fin of Metamorphosing Bullfrog Tadpole
Dev. Biol. 11: 352-37o (1965)

Vaes, G.: The Release of Collagenase as an Inactive Proenzym by Bone Explants in Culture
Biochem. J. 126: 275-289 (1972)

Weinstock, M.; C.P. Leblond: Formation of Collagen
Fed. Proc. 33: 12o5-1218 (1974)

Woessner, J.F.; R.J. Boucek: Connective Tissue Development in Subcutaneously Implanted Polyvinyl Sponge
Arch. Biochem. Biophys. 93: 85-94 (1961)

Woolley, D.E.; R.W. Glanville; M.J. Crossley; J.M. Evanson: Purification of Rheumatoid Synovial Collagenase and its Action on Soluble and Insoluble Collagen
Eur. J. Biochem. 54: 611-622 (1975)

Yardley, I.H.; M.W. Heaton; L.M. Gaines; L.E. Shulman: Collagen Formation by Fibroblasts. Preliminary Electron Microscopic Observations Using Thin Sections of Tissue Cultures
Bull. Johns Hopkins Hosp. 1o6: 381-393 (196o)

Zucker, M.B.; J. Borrelli: Platelet Clumping Produced by Connective Tissue Suspensions and by Collagen
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1o9: 779-787 (1962)

Herrn Prof. Dr. med. A. Ruiz-Torres danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und seine ständige Diskussionsbereitschaft im Verlaufe der Arbeit.
Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Merker danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.
Herrn Prof. Dr. med. G. Stüttgen bin ich zu Dank verpflichtet für seine Ratschläge bei der Versuchsplanung.
Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Stoffwechsellabors für ihre vielen praktischen Hinweise bei der Versuchsdurchführung sowie Herrn Achim Willmann für seine wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse mit dem Großrechner.

Lebenslauf

Am 4.1.1950 wurde ich als Sohn des Pfarrers Werner Zeitz und seiner Ehefrau Else, geb. Spies in Driedorf (Dillkreis) geboren. Von Ostern 1956 bis Ostern 1960 besuchte ich die Grundschule in Driedorf. Es folgte der Besuch des Johanneum-Gymnasiums in Herborn (Dillkreis), wo ich 1968 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1968/69 nahm ich das Studium der Mathematik und Physik an der Philipps-Universität in Marburg auf. Zum Sommersemester 1969 wurde ich an der Freien Universität Berlin mit Studienfach Medizin immatrikuliert; das Medizinstudium schloß ich am 28. 2.1975 mit der ärztlichen Prüfung ab. Als Medizinalassistent war ich an der Medizinischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Charlottenburg der Freien Universität Berlin, an der Unfallchirurgischen Abteilung des St.Josephs-Krankenhauses in Berlin-Tempelhof, an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik im Klinikum Charlottenburg der Freien Universität Berlin und am Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin tätig. Meine Promotionsarbeit entstand mit Mitteln der Graduiertenförderung im Stoffwechsellabor der Medizinischen Klinik im Klinikum Charlottenburg der Freien Universität Berlin.